

Aus der
Klinik für Abdominal- und Transplantationschirurgie
Humboldt-Universität zu Berlin
Charité, Campus Virchow-Klinikum
Direktor: Prof. Dr. med. P. Neuhaus

**TRANSPLANTATION VON LEBERN
NICHT-HERZSCHLAGENDER SPENDER IM
SCHWEINELEBER-TRANSPLANTATIONSMODELL**

HABILITATIONSSCHRIFT

Zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach Chirurgie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dr. med. Michael R. Schön

Berlin 1999

Diese Untersuchungen wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft,
Bonn und der Sonnenfeld-Stiftung, Berlin durchgeführt

Zusammenfassung

Es wurde untersucht ob die normotherme extrakorporale Leberperfusion (NELP) als Methode geeignet ist, Lebern vor Transplantation zu konservieren, und ob sie warm ischämische Zellschäden beheben kann. Zum ersten Mal konnte experimentell gezeigt werden, daß eine erfolgreiche Transplantation nach 4 Stunden mit NELP möglich ist und sogar so zuverlässig, wie die Kaltkonservierung in der University of Wisconsin Lösung. Die NELP erhält die Leberfunktion und ermöglicht eine Regeneration warm ischämischer Schäden in Nicht-herzschlagenden Spendern.

36 Schweine der Deutschen Landrasse wurden in sechs Gruppen transplantiert. In der Gruppe 1 wurde direkt nach Organentnahme transplantiert, in Gruppe 2 nach 4 Stunden Kaltkonservierung in der University of Wisconsin Lösung und in Gruppe 3 nach 4 Stunden NELP. In Gruppe 4 wurden die Lebern nach 60 Minuten warmer Ischämie direkt transplantiert, in Gruppe 5 nach 60 Minuten warmer Ischämie und 4 Stunden Kaltkonservierung und in Gruppe 6 nach 60 Minuten warmer Ischämie und 4 Stunden NELP. Alle Tiere deren Lebern vor Transplantation normotherm extrakorporal perfundiert wurden (Gruppen 3 und 6) überlebten mit guter Organfunktion. Im Unterschied hierzu führte die Abfolge von 60 Minuten warmer Ischämie und 4 Stunden Kaltkonservierung unweigerlich zur primären Organ-Nichtfunktion innerhalb der ersten 24 Stunden nach Lebertransplantation. Die Methode der NELP bietet die Chance eine Leber außerhalb des Körpers für Zeiträume von möglicherweise länger als 4 Stunden völlig funktionsfähig zu halten. Die NELP kann zur Organkonservierung vor Transplantation eingesetzt werden, aber auch dazu, Lebern von Nicht-Herzschlagenden Spendern zu nutzen.

Abstract

Normothermic extracorporeal liver perfusion (NELP) was studied as a means to preserve livers for transplantation and to reverse warm ischemic injury. For the first time we provide experimental evidence that successful transplantation after 4h of normothermic extracorporeal liver perfusion is possible and as reliable as 4h of cold preservation in University of Wisconsin solution. NELP preserves liver function completely and is capable of reversing 60 min of warm ischemic injury in non heart beating donors.

36 German Landrace pigs were transplanted in six groups. Group 1 animals were transplanted directly, group 2 animals after 4h of cold preservation with University of Wisconsin solution and group 3 animals following 4h of normothermic extracorporeal liver perfusion. Group 4 animals sustained 1h of warm ischemia before transplantation of the liver. In group 5 animals were transplanted following 1h of warm ischemia and 4h of cold preservation, and in group 6 after 1h of warm ischemia and 4h of normothermic extracorporeal liver perfusion. All animals receiving livers treated by normothermic extracorporeal liver perfusion survived without liver failure (group 3 and 6). In contrast, all animals in group 5 developed primary graft non-function within 24 h after transplantation. The technique of NELP holds the potential to keep a mammalian liver outside the body completely functional, possibly for longer than 4h. NELP can be

used for liver preservation prior to transplantation or to utilise organs from non-heart-beating donors.

Schlagwörter:

Lebertransplantation, Organkonservierung, Normotherme extrakorporale Leber-perfusion, Nicht-herzschlagende Organspender

Keywords:

Liver transplantation, organ preservation, normothermic extracorporeal liver perfusion, non-heart-beating-donors

Widmung

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	10
1.1	Mangel an Spenderorganen	10
1.2	Ansatzpunkte der Problemlösung	10
1.3	Fragestellungen und Zielsetzungen	10
1.4	Kalte Ischämie zur Organkonservierung	10
1.5	Nicht-herzschlagende Organspender.....	11
1.6	Normotherme extrakorporale Leberperfusion (NELP)	12
1.7	Normotherme extrakorporale Leberperfusion als Methode zur Organkonservierung.....	13
1.8	Normotherme extrakorporale Leberperfusion als Methode zur Organkonservierung von Lebern aus nicht-herzschlagenden Spendern	14
2.	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Evaluierung der Perfusatdialyse während NELP.....	15
2.1.1	Spenderorgane.....	15
2.1.2	Perfusionskreislauf.....	16
	Perfusat.....	17
	Dialysekreislauf.....	18
	Dialysat	19
2.1.3	Einteilung der Versuchsgruppen	19
2.1.4	Untersuchungsprogramm	20
	Probennahme und Bestimmungen	20
	Darstellung und Auswertung der Versuchsergebnisse	21
2.2	Lebertransplantation nach vorausgegangener NELP	22
2.2.1	Versuchstiere	22
2.2.2	Einteilung der Versuchsgruppen	22
	Gruppe 1: sofortige Lebertransplantation	22
	Gruppe 2: 4h Kaltkonservierung in UW vor Lebertransplantation	23
	Gruppe 3: 4h NELP vor Lebertransplantation	23
	Gruppe 4: 1h warme Ischämie und anschließend Lebertransplantation	26
	Gruppe 5: 1h warme Ischämie, 4h kalte Ischämie in UW und anschließend Lebertransplantation	26
	Gruppe 6: 1h warme Ischämie, 4h NELP und anschließend Lebertransplantation	26
2.2.3	Narkose	29
2.2.4	Lebertransplantation	30
	Spendertiere	31
	Empfängertiere	31
	Postoperative Nachsorge	32
2.2.5	Untersuchungsprogramm	33
	Probennahmen	33

	Prä- und postoperative Blutentnahmen	33
	Probennahmen während der extrakorporalen Leberperfusion	33
	Viabilitätsparameter	33
	Postoperative Bestimmungen im Serum	33
	Galleproduktion	34
	Darstellung und Auswertung der Versuchsergebnisse	34
2.2.6	NELP der Gruppen 3 und 6.....	36
	Neuentwicklung des Leberperfusionssystems mit integrierter Dialyse	36
	Überwachung der Druck- und Flußregulation.....	36
	Perfusionskammer und Druckoszillation	39
	Dialysekreislauf und Oxygenierung	40
	Perfusat, Dialysat und Perfusion	41
	Bestimmung in Perfusat und Dialysat.....	43
2.2.7	Licht- und Elektronenmikroskopische Untersuchungen	44
	Entnahme der Biopsien/Biopsieprotokoll	44
	Fixierung der Biopsien	45
	Präparationsmethoden für die Lichtmikroskopie	46
	Fixierung, Einbettung und Färbung	46
	Dokumentation der Lichtmikroskopie	46
	Präparationsmethoden für die Elektronenmikroskopie.....	46
	Fixierung, Kontrastierung und Nachfixierung	46
	Einbettung.....	47
	Herstellung der Semidünnschnitte.....	47
	Herstellung der Ultradünnschnitte und Nachkontrastierung	47
	Dokumentation der Transmissionselektronenmikroskopie	48
	Selektion der Biopsien für die Transmissionselektronenmikroskopie	48
3.	ERGEBNISSE	49
3.1	Evaluierung der Perfusatdialyse während NELP.....	49
3.1.1	Makroskopischer Aspekt der Lebern nach Perfusion.....	49
3.1.2	Elektrolytkonzentrationen und pH-Werte im Vergleich.....	49
	Natrium	49
	Kalium	50
	pH-Werte.....	52
3.1.3	Die Enzymaktivitäten im Vergleich	53
	GOT (AST).....	53
	GPT (ALT).....	54
	LDH	55
3.1.4	Sauerstoffverbrauch, Galle- und Harnstoffproduktion.....	56
	Sauerstoffverbrauch	56
	Galleproduktion.....	57
	Harnstoffproduktion	58
3.2	Lebertransplantation nach vorausgegangener NELP	60
3.2.1	Chirurgisches Modell.....	60
3.2.2	Primäre Organ-Nicht-Funktion nach Lebertransplantation.....	60
3.2.3	Überleben	61

3.2.4	Biochemische Parameter nach Lebertransplantation	61
	α -GST	61
	GOT	63
	GPT	64
	LDH	65
	γ GT und Bilirubin	66
	Hyaluronsäure	66
	Gesamtprotein und Albumin	68
	Thromboplastinzeit (TPZ, Quick)	69
	Kreatinin	71
3.2.5	Parameter während der vierstündigen NELP in Gruppe 3 und 6	72
	Natrium	72
	Kalium	73
	α -GST	74
	GOT	75
	GPT	76
	LDH	77
	Vergleich von α -GST, GOT, GPT und LDH untereinander	77
	Galleproduktion	78
	Gesamtprotein und Albumin	79
	Hyaluronsäure	80
	Harnstoff	81
	Ammoniak	82
	Leukozyten	83
	Thrombozyten	84
3.2.6	Morphologische Ergebnisse nach licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen	85
	Abbildung 45: Lichtmikroskopie Gruppe 1	85
	Abbildung 46: Elektronenmikroskopie Gruppe 1	86
	Abbildung 47: Lichtmikroskopie Gruppe 2	87
	Abbildung 48: Elektronenmikroskopie Gruppe 2	88
	Abbildung 49: Lichtmikroskopie Gruppe 3, Biopsie 2	89
	Abbildung 50: Elektronenmikroskopie Gruppe 3, Biopsie 2	90
	Abbildung 51: Lichtmikroskopie Gruppe 3, Biopsie 3	91
	Abbildung 52: Elektronenmikroskopie Gruppe 3, Biopsie 3	92
	Abbildung 53: Lichtmikroskopie Gruppe 4	93
	Abbildung 54: Elektronenmikroskopie Gruppe 4	94
	Abbildung 55: Lichtmikroskopie Gruppe 5	95
	Abbildung 56: Elektronenmikroskopie Gruppe 5	96
	Abbildung 57: Lichtmikroskopie Gruppe 6, Biopsie 2	97
	Abbildung 58: Elektronenmikroskopie Gruppe 6, Biopsie 2	98
	Abbildung 59: Lichtmikroskopie Gruppe 6, Biopsie 3	99
	Abbildung 60: Elektronenmikroskopie Gruppe 6, Biopsie 3	100
4.	DISKUSSION	102
4.1	Zur Wahl des Schweins als Versuchstier	102

4.2	Verbesserung der NELP	103
4.3	Lebertransplantation nach NELP.....	106
4.4	Überlebensdaten nach Lebertransplantation	107
4.5	Rückschlüsse für die Klinik	110
4.6	Einsatzmöglichkeiten der NELP als Konservierungsmethode	112
4.7	Einsatzmöglichkeiten der NELP zur Einsparung von Tierversuchen	113
4.8	Transaminasenfreisetzung nach hepatozellulären Schäden bei Ischämie	113
4.9	α -GST-Freisetzung infolge hepatozellulärer Schäden.....	114
4.10	Schlußfolgerung für die klinische Anwendung	115
4.11	Beurteilung der Perfusionsergebnisse in den Gruppen 3 und 6	116
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	118
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	119
7.	DANKSAGUNG.....	130

Verzeichnis der Abkürzungen

α -GST	α -Glutathion-S-Transferase
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Ala	Alanin
ALAT, ALT	Alaninaminotransferase (GPT)
ASAT, AST	Aspartataminotransferase (GOT)
AP	Alkalische Phosphatase
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Ca	Calcium
Ch	Charrière, 1Ch = 1/3 mm Durchmesser
Cit	Citrullin
CMV	Controlled Mechanical Ventilation
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure
Cys	Cystein
d	Tag
EC	Euro-Collins-Konservierungslösung
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
γ -GT	γ -Glutamyl-Transferase
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (ASAT)
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (ALAT)
h	Stunde
HAES	Hydroxyethylstärke
His	Histidin
HPF3	Haemaccel-Polypeptide-Fluid
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
Ile	Isoleucin
K	Kalium
KI	Kalte Ischämie
l	Liter
Leu	Leucin
LDH	Laktatdehydrogenase
LG	Lebergewicht
LM	Lichtmikroskopie
Lys	Lysin
MG	Molekulargewicht
Met	Methionin

min	Minute
mg	Milligramm
Na	Natrium
NELP	Normotherme Extrakorporale Leberperfusion
NHBD	Non-heart-beating Donor
Orn	Ornithin
p	Signifikanzniveau
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
REM	Endoplasmatisches Retikulum
S	Sekunden
SEM	Standardfehler
Ser	Serin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Thr	Threonin
TPZ	Thromboplastinzeit (Quick)
Tyr	Tyrosin
U	Units, Einheiten
UW	University of Wisconsin Lösung
WI	Warme Ischämie
Val	Valin

1. EINLEITUNG

1.1 Mangel an Spenderorganen

In den letzten vier Jahrzehnten wurde die Lebertransplantation zu einem Routineverfahren in der Behandlung von terminalen Lebererkrankungen entwickelt. Die Verbesserung der Transplantationsergebnisse hat zu einer Zunahme der Indikationsstellung geführt. Als Folge nehmen die Wartezeiten für ein geeignetes Spenderorgan weiterhin zu¹⁻⁷.

In Deutschland waren zu Jahresbeginn 1997 ungefähr 8900 Patienten für eine Organtransplantation gemeldet. Im gleichen Jahr konnten jedoch nur 3839 Transplantationen durchgeführt werden. Der größte Anteil entfiel auf Nierentransplantationen mit 60% gefolgt von Lebertransplantationen mit 20%. Der Organmangel wird besonders deutlich bei den 145 Patienten, die 1997 in Deutschland verstarben, während sie auf ein geeignetes Spenderorgan warteten. Weitere 53 Patienten mußten von der Warteliste bei Eurotransplant genommen werden, da sich ihr Allgemeinzustand derart verschlechterte, daß eine Organtransplantation ein zu großes Risiko darstellte⁸.

1.2 Ansatzpunkte der Problemlösung

Die Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO), Eurotransplant, wie auch die europäischen Pendanten UK-Transplant, Etablissement Français des Greffes und Scandiatransplant haben es sich zur Aufgabe gemacht, die Organspendebereitschaft durch eine Verbesserung der Öffentlichkeitsarbeit und Ausbildung des medizinischen Personals zu erhöhen.

Darüber hinaus gewinnen Projekte an Bedeutung, die sich mit der Erweiterung der Spenderkriterien, der Einbeziehung von Nicht-herzschlagenden Spendern oder der Verwendung von Spenderorganen transgener Tiere beschäftigen⁹⁻¹⁹.

1.3 Fragestellungen und Zielsetzungen

1.4 Kalte Ischämie zur Organkonservierung

Die Funktionsaufnahme der Leber hängt, wie auch bei anderen Organen, wesentlich vom Ausmaß der während der Ischämie eingetretenen Schädigung ab. Je geringer die Organschädigung während des Konservierungsintervalls ausfällt, um so schneller kann das Organ seine Aufgaben wieder übernehmen^{20,21}.

Die Leberprotektion ist demzufolge während des Konservierungsintervalls von besonderer Bedeutung. Das Prinzip der Organkonservierung beruht auf einer Reduzierung

der Stoffwechselaktivität durch Absenken der Temperatur. Alle transplantablen Organe werden zur Konservierung bei 0 bis 4°C kalt gelagert. Entsprechend der van't Hoff-

Gleichung verlangsamt sich hierdurch der Metabolismus auf ca. ein 12tel. Bereits bei den ersten klinischen Lebertransplantationen nutzte Starzl eine auf 15°C abgekühlte Ringer-Laktat Lösung zur Organprotektion²²⁻²⁴.

Ende der 60er Jahre folgten umfangreiche Konservierungsstudien, deren Ziel es war, den Temperaturbereich und die Zusammensetzung der Konservierungslösungen zu optimieren. Pienaar konnte im Schweinelebertransplantationsmodell zeigen, daß bereits durch Oberflächenkühlung Konservierungszeiten von 6 Stunden erreicht werden können. Wird eine Konservierungslösung zur Durchspülung der Leber eingesetzt, läßt sich im Schweinemodell der Konservierungszeitraum auf mehr als 12h verdoppeln^{20,25,26}.

Nach der Entwicklung der Euro-Collins-Lösung (EC) findet heute vor allem die University of Wisconsin-Lösung (UW) Verwendung. Im Gegensatz zur EC-Lösung handelt es sich bei der UW-Lösung um eine hyperosmolare Flüssigkeit mit den impermeablen Substanzen Hydroxyethylstärke, Raffinose und Laktobionsäure. Aber auch die auf Histidin, Tryptophan und Ketoglutarat aufbauende HTK-Lösung nach Bretschneider (HTK), wird von einigen Transplantationszentren erfolgreich eingesetzt. Wenngleich die meisten Lebern innerhalb der ersten 14 Stunden transplantiert werden, lassen sich auch Konservierungszeiten von über 24 Stunden erzielen^{22,27-29}.

1.5 Nicht-herzschlagende Organspender

Die Nutzung nicht-herzschlagender Spender (non-heart-beating donor, NHBD) zur Organspende wird bereits erfolgreich von einigen Nierentransplantationskliniken betrieben. In dieser Hinsicht führend ist die Gruppe um Kootstra aus Maastricht, NL, die mittlerweile 25% aller Spendernieren von NHBD verwenden. Rolles et al. haben erstmals erfolgreich den Versuch unternommen, den hypoxischen Nierenschaden durch retrograde Sauerstoffinsufflation zu beheben. Sie konnten an vergleichenden Transplantationsergebnissen von Nierenpärchen zeigen, daß der auftretende Ischämieschaden reversibel ist und durch die kontinuierliche Sauerstoffinsufflation günstig beeinflusst wird³⁰⁻³².

Anders als bei der Nierentransplantation, für die im Falle eines Organversagens die Hämodialyse als zuverlässiges ‚Backup-System‘ zur Verfügung steht, gibt es dies für den Leberausfall noch nicht. Die klinischen Berichte über Leberspenden von NHBD beziehen sich auf weitgehend kontrollierte Situationen in denen der meist schon laparotomierte Spender einen plötzlichen Herzstillstand erlitt oder zur Kühlung des Spenders Spülkatheter eingelegt wurden^{15,33}.

Auch zur Nutzung von warm ischämisch geschädigten NHBD Lebern für eine klinische Anwendung ist es erforderlich den Zeitraum zwischen Organentnahme beim Spender und der Transplantation des Empfängers zu überbrücken. Das Organ muß viabel erhalten werden. Es stellt sich die Frage:

Eignet sich die konventionelle Kaltkonservierung mit UW-Lösung für Lebern von NHBD?

1.6 Normotherme extrakorporale Leberperfusion (NELP)

Wird eine Leber entnommen und außerhalb des Körpers mit einer Lösung perfundiert, kann ihre Funktion für einen begrenzten Zeitraum erhalten werden. Über diese sogenannte isolierte oder extrakorporale Leberperfusion wurde erstmals 1855 von Claude Bernard berichtet. Als Perfusionsmedium diente Leitungswasser. Es gelang der Nachweis, daß Glykogen zu Glukose abgebaut wird. In der Folge erlangte die extrakorporale Leberperfusion Bedeutung als Modell in einer großen Anzahl physiologischer und biochemischer Untersuchungen. Auch zur Therapie von Patienten im fulminanten Leberversagen wurde dieses Modell wiederholt eingesetzt³⁴⁻⁴².

Bisher wurden keine Studien durchgeführt, deren Ziel es war die NELP als Instrument zur Konservierung von Lebern zu entwickeln. Als *conditio sine qua non* kann gelten, daß die NELP die Funktion der Leber während der Perfusion aufrecht erhalten muß. Somit sind höchste Ansprüche an die Perfusion - welche sich an den natürlichen Erfordernissen der Leberphysiologie orientieren sollte- zu erfüllen. Hieraus leitet sich die Frage ab:

Wodurch lassen sich die bekannten Modelle der NELP weiter verbessern?

Neuhaus entwickelte Anfang der 80er Jahre eine geschlossene und druckoszillierende Leberperfusion. Hierbei befindet sich die Leber, von einer Kunststoffhülle geschützt, in einer flüssigkeitsgefüllten, geschlossenen Perfusionskammer, auf die von außen zyklische Druckschwankungen, welche Atemexkursionen nachahmen, angelegt werden. Die portalvenösen Lumina folgen den künstlichen intraabdominellen Druckschwankungen. Das Perfusionsergebnis kann durch diese neue Perfusionstechnik, insbesondere in der Läppchenperipherie, deutlich verbessert werden. Des weiteren wird die großflächige Ausbildung von hypoperfundierten Arealen vermieden, die bedingt durch die Größe und das damit verbundene Gewicht von Schweinelebern bei der herkömmlichen Lagerung auf der Unterseite auftreten⁴³⁻⁴⁴.

Aber auch die physiologische Zusammensetzung des Perfusats ist für die Leberfunktion wichtig. Die Perfusion von Schweinelebern erfordert durch ihre Größe und die damit verbundenen Perfusatvolumina ein rezirkulierendes Perfusionsmodell. Anders ist dies bei isoliert perfundierten Rattenlebern, in denen meist Krebs-Henseleit-Lösung aus einem Reservoir perfundiert und nach Passage durch die Leber verworfen wird. In rezirkulierenden Systemen akkumuliert u.a. Kalium insbesondere dann, wenn es auf Grund von Membranschädigung, z.B. durch warme Ischämie, vermehrt zum Zelluntergang kommt. Ferner tritt eine Verschiebung des pH-Wertes im Perfusat auf. Beide Faktoren sind aus der Literatur bekannt und einer physiologischen Perfusion abträglich⁴⁵.

Eine bisher noch nicht untersuchte Möglichkeit das Perfusionsergebnis zu verbessern besteht in der Integration einer simultan durchgeführten Perfusatdialyse. Durch die Dialyse des Perfusats müßte es möglich sein sowohl die Kaliumkonzentration als auch den pH in physiologischen Bereichen zu halten. Es stellt sich somit die Frage:

Kommt es durch den Anschluß einer Hämodialyse an das rezirkulierende Perfusionssystem zu einer verbesserten Leberfunktion?

1.7 Normotherme extrakorporale Leberperfusion als Methode zur Organkonservierung

Warme Ischämie geht mit Funktionsverlust des Gewebes einher. Dieser Funktionsverlust ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Hierzu zählen u.a. das Gewebe, der Ernährungszustand und die Reperfusion⁴⁶⁻⁵².

Falls es eine Möglichkeit gäbe die NELP zur Organkonservierung zu nutzen, ließe sich eine warm ischämische Phase während der Transplantation nicht vermeiden. Dieses Intervall müßte jedoch so kurz sein, daß es nach Reperfusion nicht zu einem primären Organversagen kommt. Klinische Studien konnten zeigen, daß gesunde, nicht zirrhotische Lebern, Ischämiezeiten von 90 min tolerieren, ohne daß es zu einem Organversagen kommt. Nordlinger et al. klemmten den Leberhilus in 20 kg schweren Schweinen für einen Zeitraum von bis zu drei Stunden ab. Eine zweistündige, warme Ischämie wurde gut toleriert. Hickman et al. transplantierten Schweinelebern nach einer und nach zwei Stunden warmer Ischämie. Während die erste Gruppe überlebte, wurden zwei Stunden warme Ischämie nicht toleriert. In einem Schweineleber-Perfusionsprojekt konnte gezeigt werden, daß der hepatozelluläre Schaden nach einem Zeitraum von 75 min warmer Ischämie bei 37°C, durch eine dreistündige NELP reversibel ist⁵³⁻⁵⁶.

Die Beurteilung von Leberperfusionssystemen beruht bisher auf allgemein akzeptierten Viabilitätsparametern wie Galleproduktion, Freisetzung von Transaminasen und histologischen Untersuchungen. Der endgültige Nachweis für die Funktionsfähigkeit der Leber nach NELP ist jedoch das Funktionieren dieser Organs im Empfänger nach Transplantation⁵⁷⁻⁶¹. Es schließt sich somit die Frage an:

Eignet sich die normotherme extrakorporale Leberperfusion als Methode zur Organkonservierung?

1.8 Normotherme extrakorporale Leberperfusion als Methode zur Organkonservierung von Lebern aus nicht-herzschlagenden Spendern

Während zur Organkonservierung durch NELP nur die Phase der Lebertransplantation als warm ischämisches Intervall anfallen würde, wäre zur Nutzung von NHBD Lebern darüber hinaus auch das Intervall zu überbrücken, das zwischen Herzstillstand des Spenders, der Leberexplantation und der Reperfusion in der NELP auftritt.

Der NELP fielen somit zwei Aufgaben zu: erstens den warm ischämischen Schaden aus Phase 1 zu regenerieren sowie zweitens ein Monitoring der Organfunktion während der Perfusionsphase zu ermöglichen.

Die sofortige Funktionsaufnahme des Organs nach einer Lebertransplantation ist für den Patienten lebensnotwendig, da ein Ersatzverfahren, wie es zum Beispiel die Dialyse bei der Nierentransplantation darstellt, fehlt. Infolgedessen wäre es für eine mögliche Nutzung von NHBD zur Lebertransplantation sinnvoll, wenn die anschließende Konservierungsmethode ein Funktionsmonitoring vor Transplantation erlaubt und ein sicheres Funktionieren des Organs nach Transplantation gewährleistet. Die Funktionskontrolle in der Konservierungsphase sollte es ermöglichen, viable von nicht-viablen Lebern zu unterscheiden. Die statische Kaltkonservierung, wie sie bisher erfolgreich bei Transplantationen mit Organen herzschlagender Spender eingesetzt wird, erlaubt ein solches Funktionsmonitoring vor Transplantation jedoch nicht.

Letztlich soll die Frage beantwortet werden, ob die NELP eine geeignete Methode zur Konservierung von NHBD Lebern darstellt.

2. MATERIAL UND METHODEN

Die vorliegende Arbeit setzt sich aus zwei aufeinander aufbauenden Projekten zusammen:

1. Evaluierung eines Dialysekreislaufs während NELP
2. Lebertransplantation nach vorausgegangener NELP

Im folgenden werden die unterschiedlichen Versuchsaufbauten und Abläufe für die beiden Projekte separat beschrieben.

2.1 Evaluierung der Perfusatdialyse während NELP

2.1.1 Spenderorgane

Die Lebern stammten von zwei Berliner Schlachthöfen, dem Großschlachthof an der Beusselstraße und dem Schlachthof an der Amendestraße. Bei den Schweinen handelte es sich um Masttiere der Deutschen Landrasse. Die Schweine wurden durch CO₂-Narkose bzw. Elektroschock betäubt und mittels Ausbluten getötet. In einem sterilen Behälter wurde jeweils ein Liter des Schweinevollbluts aufgefangen. Zur Antikoagulation wurden 500 IE Heparin (Liquemin[®], Roche, Grenzach-Wyhlen) zugegeben. Nach Ausbluten und Reinigen des Tiers erfolgte eine mediane Thorakotomie und Laparotomie. Das Herz, die Lungen und die gesamten viszerale Organe wurden en bloc entnommen und abseits des eigentlichen Schlachtvorganges präpariert.

Die suprahepatische Vena cava inferior wurde am Eintritt ins Zwerchfell durchtrennt. Von links beginnend erfolgte die Präparation entlang der kleinen Magenkurvatur unter Durchtrennung und Ligatur der Arteria gastrica sinistra sowie des lymphatischen Gewebes. Anschließend wurden im Leberhilus die Arteria hepatica communis und der Ductus choledochus, die Vena portae und die infrahepatische Vena cava inferior aufgesucht und mit ausreichendem Abstand zum Eintritt in die Leber durchtrennt. Die Organpräparation dauerte im Mittel 10 min. Die isolierte Leber wurde in einem sterilen Kunststoffbeutel verpackt und in einem 37°C warmen Wasserbad in das Labor transportiert.

Im Labor wurden Kanülen zum Anschluß an die Perfusionsapparatur in die A. hepatica communis und V. portae gelegt und ligiert. Um die Galleproduktion beurteilen zu können und keine Verletzung des Gallenblasenbetts zu riskieren, wurde auf eine Cholecystektomie verzichtet und dafür der Ductus cysticus unterbunden. Zur Ableitung der Galle wurde ein Kunststoffschlauch (Heidelberger Verlängerung, Braun/Melsungen) in den Ductus choledochus eingelegt und ligiert.

2.1.2 Perfusionskreislauf

Die Perfusionsapparatur bestand aus:

- zwei Rollerpumpen (Fa. Stöckert, München), wie sie in Herz-Lungen-Maschinen zum Einsatz kommen
- einem Membranoxygenator (Cobe CML Disposable Membrane Oxygenator, Cobe, München)
- einem temperierbaren Reservoir
- einem Auffanggefäß sowie
- einem Silikonschlauch-System (Silicon Tubing, Aromado Medizin Technik, Düsseldorf), das die einzelnen Komponenten miteinander verband und eine rezirkulierende Perfusion ermöglichte.

Die Temperierung erfolgte über einen Wärmetauscher (Stöckert/München) und die Druckmessung mittels eines Druckaufnehmers vor der Leberarterie. Dieser Perfusionskreislauf entsprach weitgehend dem, der in einem vorhergehende Projekt⁵⁶ benutzt worden war.

Nach einer Ischämiezeit von 90 min wurde die Leber in das mit 37°C warmer Perfusionslösung gefüllte Auffanggefäß gelegt. Die V. portae und die A. hepatica wurden nun an den Perfusionskreislauf angeschlossen und die Perfusion begonnen. Die A. hepatica wurde über die noch offene A. gastroduodenalis entlüftet und anschließend ligiert. Die Entlüftung der V. portae erfolgte durch Füllen der Kanüle vor Konnektion an das Schlauchsystem.

Aus dem mit Perfusat gefüllten Reservoir des Membranoxygenators wurde die V. portae passiv durch Schwerkraft perfundiert. Der so erzielte Druck entsprach, in Abhängigkeit vom Leberwiderstand, einer Wassersäule von 10-20 cm. Die Perfusion der A. hepatica erfolgte druckkontrolliert mittels einer Rollerpumpe aus dem Flüssigkeitsreservoir. Der mittlere Druck lag zwischen 60-80 mmHg. Bezogen auf das Lebergewicht wurde ein Gesamtfluß von etwa 1-2 ml/g min erreicht. Der portalvenöse Fluß betrug ca. 2/3 und der arterielle Fluß etwa 1/3 der Gesamtflußmenge.

Der Abfluß aus der Leber erfolgte über die Venae hepaticae und die Vena cava inf. in das Auffanggefäß. Die zweite Rollerpumpe förderte Perfusat vom Auffanggefäß durch den Oxygenator in das Reservoir. Der Oxygenator wurde mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) durchströmt. Für die Regelung der Perfusatemperatur auf 37±0,25°C wurde die IST-Perfusatemperatur im Schlauchsystem vor Eintritt des Perfusats in die Leber gemessen.

Das Flußschema des Kreislaufs ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

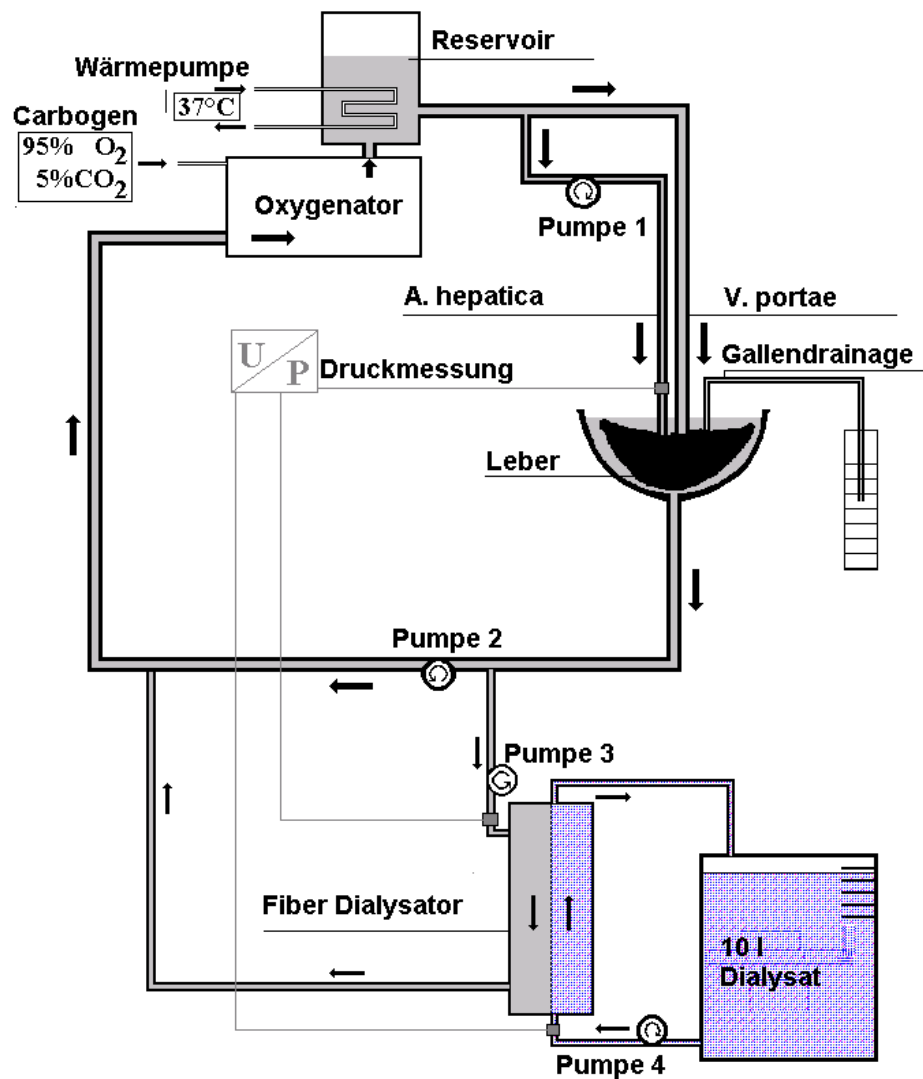


Abbildung 1: Schema des Perfusionssystems

Perfusat

Das verwendete Perfusat basierte auf einer in seiner Zusammensetzung dem Plasma ähnlichen Lösung. Bezeichnet wird diese Lösung als HPF 3. Sie besteht aus einem kristallinen Anteil und einem kolloidalen Lösungsmittel, dem Gelatine-Polypeptid (Hämaccel 35, Behring Werke, Marburg)^{62,63}. 3 Liter HPF 3 wurden zu 1 Liter Vollblut gegeben. Daraus resultierte ein Hämoglobinwert von etwa 5 g/dl mit einem Hämatokrit von ca. 18%. Tabelle 1 gibt die Zusammensetzung von HPF 3 wieder. Vor Beginn der Perfusion wurden zur Bakteriotase einmalig 20 mg Tobramycin (Lilly, Gießen) zugegeben.

Komponente	Konzentration
Na ⁺	141 mmol/l
K ⁺	3,3 mmol/l
Ca ²⁺	1,6 mmol/l
Mg ²⁺	0,5 mmol/l
Cl ⁻	116 mmol/l
(HCO ₃) ⁻	25 mmol/l
(SO ₄) ²⁻	0,5 mmol/l
(HPO ₄) ²⁻	0,6 mmol/l
(H ₂ PO ₄) ⁻	0,4 mmol/l
Glucose	5 mmol/l
Fructose	5 mmol/l
Linolsäure	1 mmol/l
Gelatine-Polypeptid	17,5 g/l
pH-Wert	7,4
Osmolalität	310 mosm/kg

Tabelle 1: Zusammensetzung der HPF 3-Lösung

Dialysekreislauf

Der Perfusionsaufbau wurde in Gruppe 2 um einen Dialysekreislauf erweitert. Der Dialysekreislauf wurde im Bypass angeschlossen (Abb.1). 1/5 des Perfusatflusses wurden hinter dem Auffanggefäß in den Dialysekreislauf und vor dem Oxygenator zurück in den Perfusionskreislauf gepumpt.

Der Dialysekreislauf bestand aus zwei Rollerpumpen (Stöckert, München), einem Dialysator (Gambro ALWALL GFS 12 Fiber Dialyzer, Gambro, Hechingen) und einem offenen 10l-Vorratsgefäß, welches das Dialysat enthielt.

Eine Rollerpumpe förderte das Perfusat durch das Kapillarsystem des Dialysators und zurück in den Perfusionskreislauf. Die zweite Rollerpumpe förderte das Dialysat im Gegenstrom. Jeweils vor dem Dialysator wurden die Drücke auf Perfusat- und Dialysatseite gemessen. Die transmembranöse Druckdifferenz wurde so gewählt, daß es zu keinem Flüssigkeitsübertritt von einem in das andere Kompartiment kam. Somit konnten Volumenverschiebungen zwischen dem Perfusat und dem Dialysat vermieden werden. Die Volumenregulation auf Perfusat- und Dialysatseite erfolgte bei Druckgleichheit auf beiden Seiten der Kapillaren über die Flußeinstellung.

Dialysat

Das Gesamtvolumen des eingesetzten Dialysats betrug 10l. Es wurde während der Perfusion nicht ausgewechselt. Die Zusammensetzung des Dialysats (Gambro, Hechingen) ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Komponente	Konzentration
Na ⁺	140 mmol/l
K ⁺	3,0 mmol/l
Ca ²⁺	0,8 mmol/l
Mg ²⁺	0,375 mmol/l
Cl ⁻	113 mmol/l
(CH ₃ COO) ⁻	2,5 mmol/l
(HCO ₃) ⁻	37 mmol/l
Glucose	5 mmol/l
pH-Wert	7,5
Osmolalität	296 mosm/kg

Tabelle 2: Zusammensetzung des Dialysats

2.1.3 Einteilung der Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 33 Lebern entnommen. In 7 Versuchen, 3 in Gruppe 1 und 4 in Gruppe 2, mußte auf eine Auswertung wegen technischer Defekte, die unabhängig von den zu untersuchenden Parametern waren, verzichtet werden. Hierzu zählten 1x Luftembolie über die Gefäße, 2x geplatzte Schläuche, 1x Gerinnung des Perfusats im Transportbehälter, 2x Überschreiten der 90 min warmer Ischämie sowie 1x Stromausfall.

Um einen systematischen Fehler durch Trainingseffekt auszuschließen, wurden die Versuche abwechselnd durchgeführt. Die Modifikation der Perfusionsapparatur bestand im Abklemmen des Dialysekreislaufs.

Alle Lebern (n=26) wurden einer warmen Ischämiezeit von 90±2 min bei 37°C ausgesetzt. Anschließend wurden die ischämisch geschädigten Lebern über einen Zeitraum von 180 min isoliert extrakorporal perfundiert. Der einzige Unterschied zwischen beiden Gruppen war der Anschluß des Dialysekreislaufs während der Perfusion in Gruppe 2. Das Leberfeuchtgewicht in Gruppe 1 betrug 758±122 g in Gruppe 2 750± 89 g.

2.1.4 Untersuchungsprogramm

Probennahme und Bestimmungen

Dem zirkulierenden Perfusat beider Gruppen wurden für die laborchemische Untersuchung Proben vor Anschluß der Leber an den Kreislauf, nach 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min Perfusion entnommen. In Gruppe 2 wurden darüber hinaus die gleichen Meßgrößen auch im Dialysat bestimmt. Die erste Entnahme erfolgte vor Anschluß der Leber an den Kreislauf, nach 90 und 180 min Dialyse.

Die Analyten Natrium, Kalium, GOT, GPT, LDH und Harnstoff wurden im Zentrallabor der Klinik auf den Multianalysengeräten Bayer Dax 72 (Bayer Diagnostik/München) sowie Hitachi 911 (Boehringer/Mannheim) nach den optimierten Standardmethoden der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie bestimmt.

Blutgasanalysen wurden zu den Zeitpunkten der Probennahmen für die laborchemischen Untersuchung durchgeführt. Zur Berechnung des Sauerstoffverbrauches erfolgten die Messungen nach Anschluß der Lebern jeweils vor (arteriell) und nach (venös) Leberpassage. In der Gruppe 2 wurden aus dem Dialysat ebenfalls Proben gewonnen. Die untersuchten Analyten waren für das Perfusat: pH, O₂- und CO₂-Partialdruck, Standard-Bikarbonat und O₂-Sättigung, im Dialysat nur der pH. Die Bestimmungen erfolgten an einem ABL 501 Blutgasanalysengerät (Radiometer, Kopenhagen, DK).

Der Sauerstoffverbrauch VO₂ ergibt sich nach dem Fickschen Prinzip aus der Durchblutungsgröße Q und der Differenz der O₂-Konzentrationen avD_{O2} aus dem zufließenden arteriellen und abfließenden venösen Blut entsprechend der Gleichung: VO₂ = avD_{O2} x Q. Die Differenz der O₂-Konzentrationen avD_{O2} berechnete sich hierbei als die Differenz des Gehaltes an chemisch gebundenem Sauerstoff im arteriellen und venösen Blut:

$avD_{O_2} = [O_2]_{art.} - [O_2]_{ven.}$. Der Gehalt an chemisch gebundenem Sauerstoff berechnet sich unter Berücksichtigung der Hüfner-Zahl (1,34 für Blut) aus der Hämoglobinkonzentration [Hb] und der Sauerstoffsättigung SO₂ und wird als Sauerstoffkonzentration [O₂] angegeben:

$$[O_2] = 1,34 \times [Hb] \times S_{O_2} \times 10^{-5} .$$

Die Galle wurde über einen in den Ductus choledochus eingebundenen Schlauch in ein separates Röhrchen mit Millilitereinteilung abgeleitet und stündlich abgelesen. Somit konnte kontinuierlich die Galleproduktion gemessen werden.

Nach Reperfusion wurden die Lebern makroskopisch beurteilt. Kriterien waren die gleichmäßige rosige Färbung, das Auftreten von dunklen Arealen als Zeichen einer inhomogenen Perfusion mit mangelperfundierten Arealen sowie die Konsistenz der Lebern.

Darstellung und Auswertung der Versuchsergebnisse

Die Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgte als Mittelwert \pm SEM der in den jeweiligen Gruppen erhobenen Werte. Aus den vor Anschluß des Perfusionskreislaufs gewonnenen Proben (n=26) wurden die Ausgangswerte für Natrium, Kalium, GOT, GPT, LDH und Harnstoff ermittelt (Tabelle 3) und mit den in der Literatur angegebenen Referenzbereichen verglichen (Tabelle 4). GOT, GPT, LDH und Harnstoff wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Versuche auf ein Lebergewicht von 100g bezogen.

Die Nettobilanzen drücken aus, ob ein Stoff von seiner Anfangskonzentration oder – Aktivität im Perfusat während der Perfusion in seiner Konzentration oder Aktivität zunimmt, somit von den Zellen in das Perfusat freigesetzt wird, oder abnimmt, somit von den Zellen aus dem Perfusat aufgenommen wird. Neben der Gesamtbilanz für einen Stoff während der dreistündigen Perfusion bezogen auf den Ausgangswert im Perfusat wurden zudem Bilanzen für die ersten 90 min bezogen auf den Ausgangswert und für die folgenden 90 min bezogen auf den 90 min Wert berechnet. Somit konnte beurteilt werden, in welcher Phase der Perfusion der entsprechende Stoff in das Perfusat freigesetzt oder aus dem Perfusat aufgenommen wird. Da das Verteilungsvolumen durch die parallele Dialyse in der Gruppe 2 für dialysierbare Substanzen um 10l größer war als in Gruppe 1, wurde in beiden Gruppen die Gesamtkonzentration umgerechnet in die absolute Menge eines Stoffes im Perfusat und dem Dialysat.

Signifikante Unterschiede bei Anschluß des Dialysekreislaufs wurden durch einen Vergleich der jeweiligen Parameter beider Gruppen mit dem parametrischen t-Test bzw. dem verteilungsfreien Mann-Whitney Ranksummentest untersucht. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ definiert.

Komponente	Konzentration	
Natrium	145 \pm 1,0	mmol/l
Kalium	5,0 \pm 0,4	mmol/l
GOT	5,4 \pm 1,4	U/l pro 100g
GPT	1,4 \pm 0,2	U/l pro 100g
LDH	20 \pm 2,0	U/l pro 100g
Harnstoff	1,3 \pm 0,2	mg/dl pro 100g
pH-Wert	7,4 \pm 0,01	

Tabelle 3: Ausgangswerte (n=26) im Perfusat nach Zugabe von HPF3.

2.2 Lebertransplantation nach vorausgegangener NELP

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere fanden weibliche Hausschweine der Deutschen Landrasse im Alter von zweieinhalb bis vier Monaten mit einem Gewicht von 24 ± 6 kg Verwendung. Die Schweine wurden in der Woche vor dem Experiment vom Züchter (Sommerfeld, Brandenburg) angeliefert. Die Unterbringung erfolgte im Forschungshaus der Charité, Campus Virchow-Klinikum. Die Tiere wurde vom Veterinär untersucht, gewogen und zunächst gemeinsam in einem Auslauf mit freiem Zugang zum Wasser untergebracht. Sie wurden zweimal am Tag mit standardisierter und pelletierter Nahrung gefüttert (Mpig-H, Sniff Spezialitäten GmbH, Soest) und bei einer Umgebungstemperatur zwischen $20-22^{\circ}\text{C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von 50-70% gehalten.

Am Tag vor der Transplantation wurden drei Schweine von der Gruppe isoliert und einzeln in Käfigen untergebracht: Ein Schwein als Spender, eins als Empfänger und eins als Ersatztier. Als Spender-Empfänger-Paar wurden Tiere mit ähnlichem Gewicht ausgewählt. 24 Stunden vor dem Versuch erhielten die Tiere nur Wasser und wurden nüchtern belassen.

Die Versuche waren zuvor von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales, Berlin, genehmigt worden und wurden vom Tierschutzbeauftragten ständig überwacht.

2.2.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Es wurden sechs Versuchsgruppen gebildet. Die Versuchsgruppen unterschieden sich nur in der Behandlung der Spenderlebern. Die Technik der Spenderoperation ist im Detail in Kapitel 2.2.4 erläutert. Es wurden sechs Versuche pro Versuchsgruppe durchgeführt. Die Abfolge der Versuche wurde randomisiert, um den Einfluß eines möglichen Trainingseffekts zu minimieren.

Gruppe 1: sofortige Lebertransplantation

In Gruppe 1 wurden das Spender- und Empfängertier mit zwei Operationsteams simultan operiert, um im Anschluß an die Hepatektomie sofort transplantieren zu können. Die Transplantation der Spenderleber erfolgte sofort nach Entnahme ohne Konservierung oder Perfusion. Die operationstechnisch bedingte warme Ischämie bis zur Reperfusion im Empfänger betrug dabei 36 ± 3 min.



Abbildung 2: Gleichzeitige Operation von Spender und Empfänger in Gruppen 1 und 4.

Gruppe 2: 4h Kaltkonservierung in UW vor Lebertransplantation

In Gruppe 2 wurden nach Präparation der Leber Perfusionskanülen in die Vena portae und Aorta gelegt. Zur Organkonservierung wurden 1l 4°C kalter UW-Lösung portal und 500 ml aortal infundiert. Anschließend wurde die Spenderleber steril in einem mit UW-Lösung gefüllten Kunststoffbeutel eingepackt und in einer Kühlbox mit Eiswasser über 4h bei 0°C konserviert. Eine Stunde vor Ende der Kaltkonservierung wurde das Empfängertier vorbereitet und hepatektomiert, so daß nach 4h ohne Verzögerung mit der Transplantation begonnen werden konnte. Die Aufwärmzeit zwischen Entnahme aus der kalten Konservierungslösung und Reperfusion im Empfänger nach Lebertransplantation betrug 35 ± 5 min.

Gruppe 3: 4h NELP vor Lebertransplantation

In Gruppe 3 wurden die infrahepatische Vena cava inferior der Spenderleber, der Truncus coeliacus, Vena portae und der Ductus choledochus mit Nirosta-Spiralen tragenden Perfusionsschläuchen kanüliert (Abb. 3). Diese Schläuche wurden durch die

halbmondförmige Durchtrittsplatte der Perfusionskammer gezogen (Abb.4). Die suprahepatische Vena cava inferior wurde abgeklemmt und ligiert. Anschließend wurde die Leber entnommen und in einen sterilen Perfusionsbeutel gelegt und in den Perfusionsraum transportiert. Es erfolgte der Anschluß der Leber an den vorbereiteten Perfusionskreislauf. Mit Reperfusion in der NELP-Maschine wurden ca. 250 ml Perfusat verworfen, bevor der rezirkulierende Kreislauf hergestellt wurde. Für die Entnahme, die Platzierung der Kanülen und den Anschluß der Leber wurden 15 ± 3 min benötigt. Die Leber wurde in der Perfusionskammer für 4h normotherm bei 37°C perfundiert. Eine Stunde vor Perfusionsende wurde mit der Empfängeroperation begonnen. Nach Entnahme der Spenderleber aus der NELP-Maschine dauerte es 35 ± 5 min Minuten bis zur Perfusion im Empfänger.

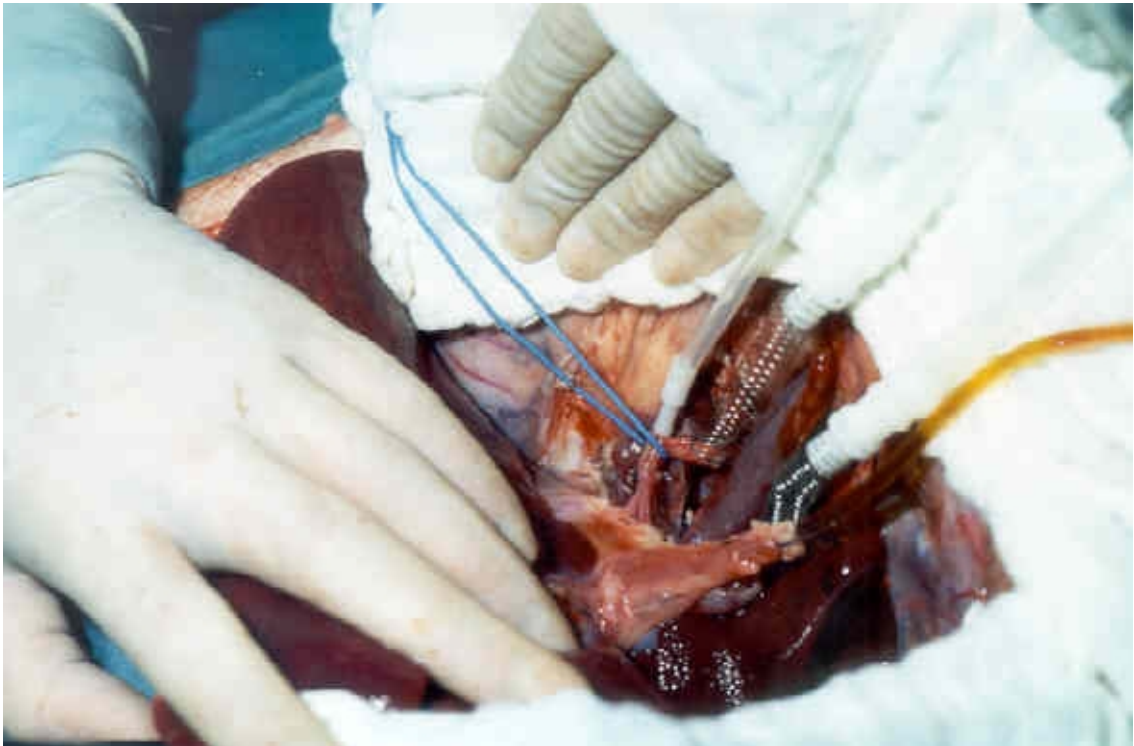


Abbildung 3: Platzierung der mit Spiralen versehenen Perfusionsschläuche in V. portae und infrahepatischer V. cava inf. sowie in Ductus choledochus und A. hepatica

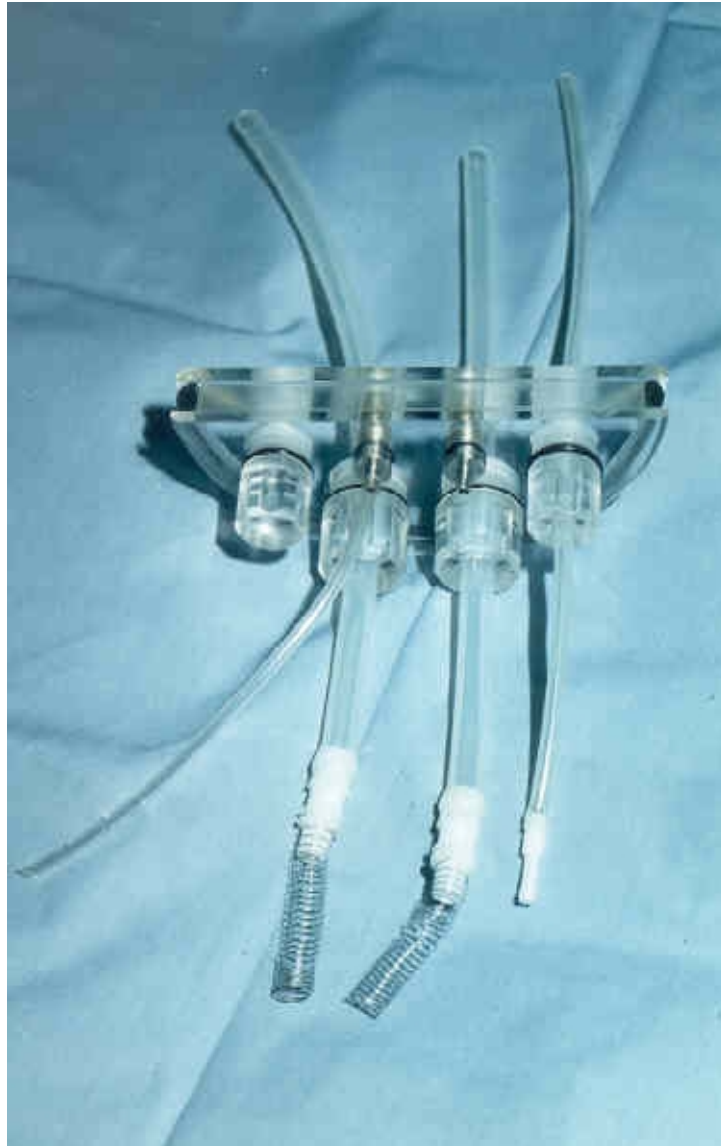


Abbildung 4: Plazierung der Schläuche in der Durchtrittsplatte für die Perfusionskammer

Gruppen 4, 5 und 6: 1h warme Ischämie vor Lebertransplantation

In den Gruppen 4, 5 und 6 wurde die Spenderleber für eine rasche Entnahme vorbereitet. Nach Laparotomie wurde die Leber freipräpariert, das Lig. hepatoduodenale durchtrennt und ligiert, die zu- und abführenden Gefäße der Leber blieben dabei intakt. Anschließend wurden 10.000 IE Heparin injiziert. Unter Narkose wurde durch Entblutung der Herzstillstand beim Spendertier herbeigeführt. Anschließend wurden die Bauchdecken aneinander gelegt und mit Bauchtuchklemmen verschlossen, um eine Abkühlung der intraabdominellen Organe zu vermeiden. Da das Spendertier weiterhin auf der Wärmeplatte lag, sank die Temperatur des Abdomens, die jeweils am Ende des 60 minütigen Ischämieintervalls gemessen wurde, wie auch die weiterhin online bestimmte Körperkerntemperatur nicht unter 34°C. Exakt nach 60 min wurden die Bauchtuchklemmen gelöst, die V. portae, die Aorta, der Ductus choledochus sowie die supra- und infrahepatische V. cava inferior durchtrennt.

Gruppe 4: 1h warme Ischämie und anschließend Lebertransplantation

Anschließend erfolgte in Gruppe 4 analog zur Gruppe 1 die sofortige Transplantation in den vorbereiteten Spender. Nach Explantation aus dem nicht herzsschlagenden Spender bis zur Reperfusion im Empfänger vergingen 43 ± 4 min. Die Lebern der Gruppe 4 waren somit für einen mittleren Zeitraum von 103 ± 4 min ischämisch.

Gruppe 5: 1h warme Ischämie, 4h kalte Ischämie in UW und anschließend Lebertransplantation

In Gruppe 5 wurde die Infusion von 1l 4°C kalter UW-Lösung portal und 0,5l arteriell auf dem Backtable analog zu Gruppe 2 durchgeführt. Die Konservierungszeit betrug 4h. Von der Entnahme aus dem 0°C kalten Konservierungsbeutel bis zur Reperfusion im Empfängertier vergingen 35 ± 5 min.

Gruppe 6: 1h warme Ischämie, 4h NELP und anschließend Lebertransplantation

In Gruppe 6 wurde analog zu Gruppe 3 vorgegangen. Hierzu wurden die Perfusionskanülen mit Nirosta-Spiralen in die entsprechenden Gefäße plaziert, die Leber im Perfusionsbeutel zur Leberperfusionsmaschine transportiert und angeschlossen (Abb. 5). Für die Entnahme, die Platzierung der Kanülen und den Anschluß der Leber wurden 16 ± 3 min benötigt. Der Perfusionszeitraum betrug 4 Stunden. Bis zur Reperfusion im Empfängertier vergingen nach der Beendigung der NELP 37 ± 6 min.

Das auf der über nächsten Seite folgende Schema der Abbildung 6 verdeutlicht den Aufbau des Versuchsprotokolls.

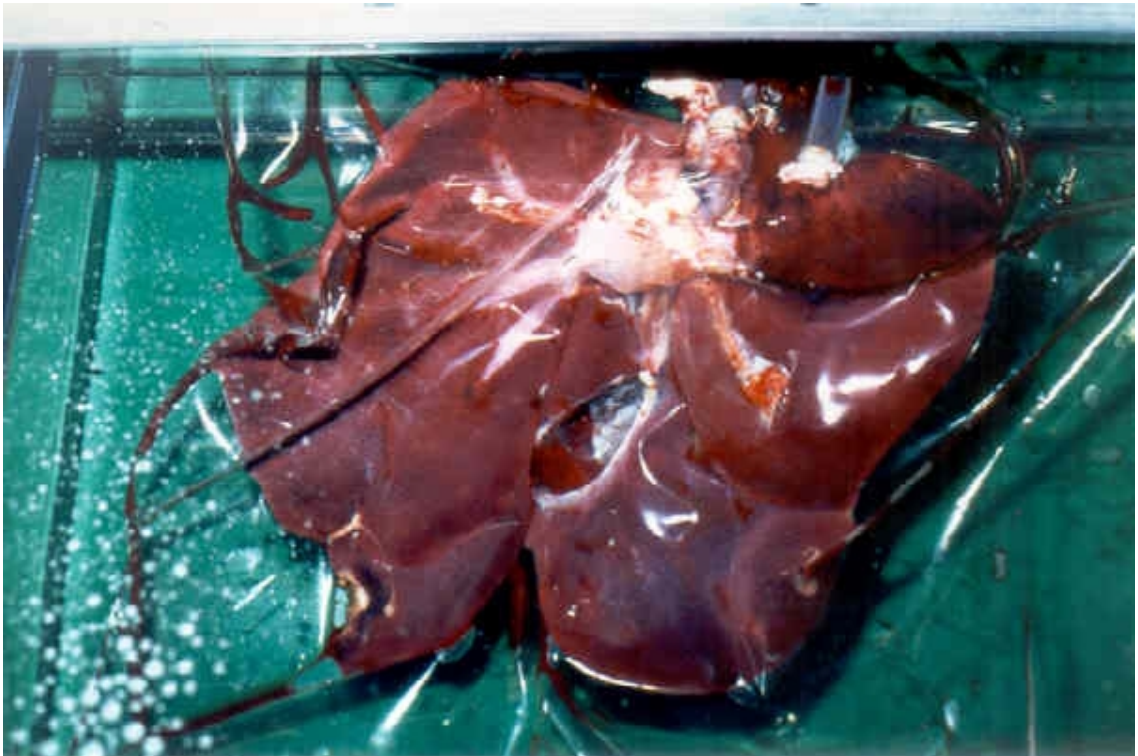


Abbildung 5: Blick durch den Deckel der Perfusionskammer auf die perfundierte Leber fünf Minuten nach Reperfusion. Der sterile Kunststoffbeutel isoliert die Leber vom temperierten Wasser der Perfusionskammer. Die Leber schwimmt ohne Kontakt zu den Plexiglaswänden in der Perfusionskammer. Gut sichtbar ist der Silikonschlauch der Pfortader und rechts davon der Silikonschlauch der V. cava. In Bildmitte befindet sich das Gallenblasenbett nach Cholecystektomie.

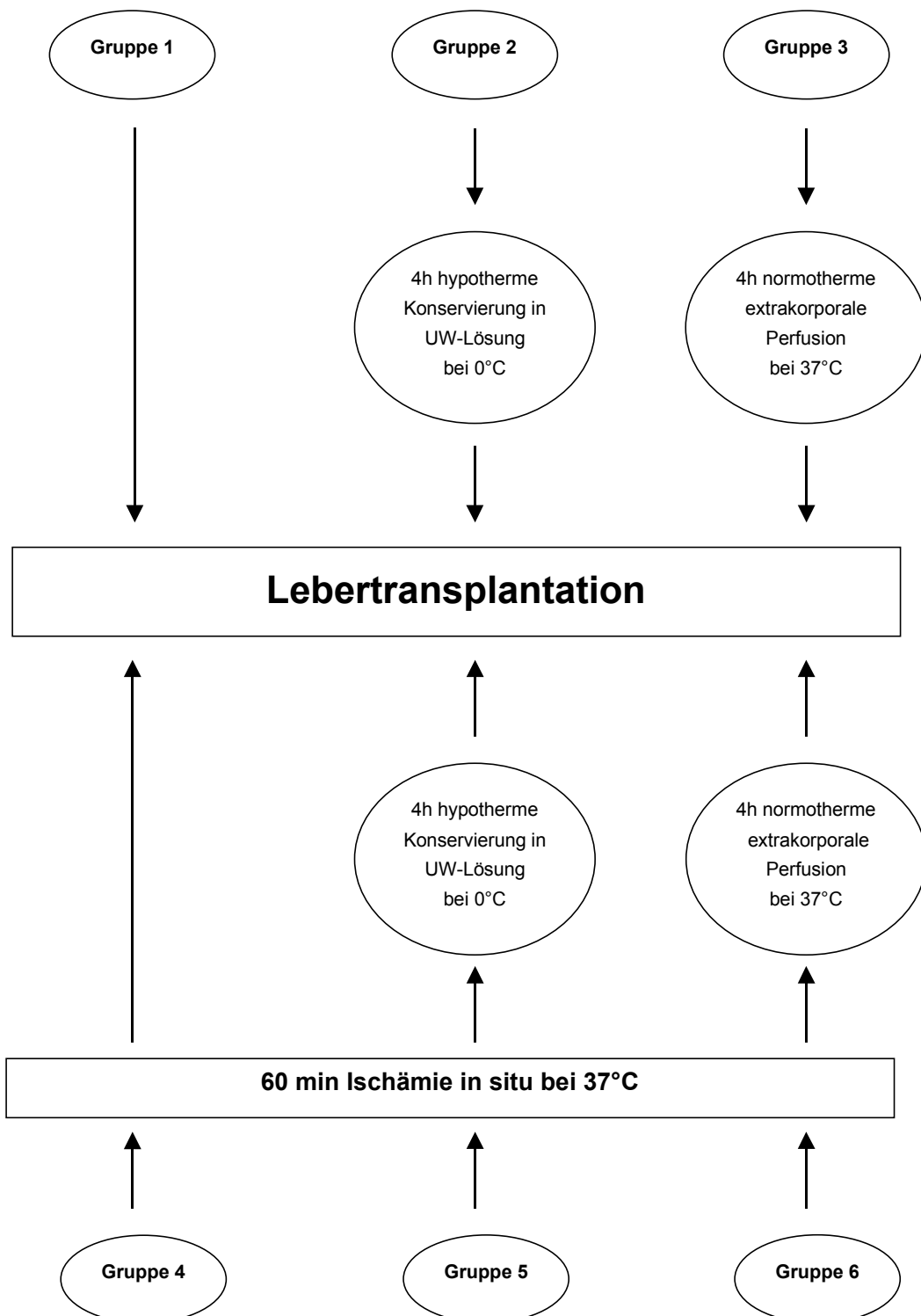


Abbildung 6: Übersicht der Versuchsgruppen

2.2.3 Narkose

Die Prämedikation der Schweine erfolgte mit einer intramuskulären Injektion von 4 mg/kg Körpergewicht Azoperon (Stresnil®, Janssen-Cilag, Neuss) und 0,5 mg Atropinsulfat (Braun, Melsungen) in die Nackenmuskulatur. Eine ausreichende Sedierung war 15 bis 20 min nach Prämedikation erreicht. Das sedierte Schwein wurde auf einem Operationstisch mit unterliegender Wärmeplatte gelagert und in den Narkoseeinleitungsraum gebracht. Es wurden zwei Braunülen in die Ohrvenen jeder Seite gelegt. Die Narkose wurde mit Metomidatehydrochlorid (Hypnodil®, Janssen-Cilag, Neuss) in einer Dosierung von 4 mg/kg Körpergewicht und 0,1 bis 0,2 mg Fentanyl (Fentanyl®, Janssen-Cilag, Neuss) als Bolusinjektion eingeleitet. Anschließend wurde endotracheal intubiert und mit 4 mg Pancuroniumbromid (Pancuronium Curamed®, Schwabe-Curamed, Karlsruhe) relaxiert. Als Beatmungssystem diente ein Siemens 900 Respirator. Es wurde eine volumenkontrollierte CMV-Beatmung mit einem inspiratorischen Gasgemisch aus 40% O₂ und 60% CO₂ durchgeführt. Es wurde Normokapnie (CO₂-Partialdruck im arteriellen Blut: 36 bis 40 mmHg) angestrebt und durch regelmäßige Kontrollen der arteriellen Blutgase (ABL Autoanalyzer, Radiometer, Kopenhagen, DK) sichergestellt. Die Atemfrequenz lag zwischen 8 und 10 min⁻¹ und das Atemminutenvolumen je nach Körpergewicht des Schweins und den Ergebnissen der Blutgasanalysen zwischen 3,2 und 4 l/min. Mit der Blutgasanalyse wurden in regelmäßigen Abständen außer pO₂ und pCO₂ auch der Basenüberschuß, O₂-Sättigung, pH, Hämoglobin, Hämatokrit, Natrium und Kalium bestimmt.

Die Füße der Schweine wurden am Operationstisch fixiert, Bauch und Hals rasiert und abgewaschen. Am Thorax wurden drei Elektroden zur EKG-Ableitung befestigt. Beim Empfängertier wurde ein Blasenkatheter mit einer Temperatursonde bei steriler Vorgehensweise gelegt. Anschließend wurde die linke Arteria carotis communis perkutan unter sterilen Kautelen punktiert und ein Katheter für die kontinuierliche invasive Blutdruckmessung und für Blutentnahmen eingeführt. In die linke Vena jugularis externa wurde eine Schleuse gelegt, über die beim Spendertier ein zentraler Venenkatheter in die Vena cava superior geschoben wurde. Beim Empfängertier wurde unter EKG-Kontrolle und kontinuierlicher invasiver Druckmessung ein Swan-Ganz-Katheter in die Pulmonalarterie eingeschwenkt. Das vorbereitete Schwein wurde anschließend in den Operationssaal gebracht und an den entsprechenden Monitor und den Siemens 900 Respirator angeschlossen.

Die Narkose wurde durch kontinuierliche Infusion von Metomidatehydrochlorid (Hexal, Holzkirchen) und Fentanyl aufrechterhalten. Über zwei Perfusoren wurde Metomidatehydrochlorid in einer Dosierung von 0,1 mg/kg min sowie Fentanyl in einer Dosierung von 0,15 µg/kg min kontinuierlich intravenös über die Ohrvenen infundiert. Zur Relaxation wurden bei Bedarf Repetitionsgaben von 1 - 4 mg Pancuroniumbromid verabreicht. Intraoperativ wurden Atemfrequenz, Atemzugvolumen, Atemminutenvolumen, Atemspitzendruck, inspiratorische Sauerstoffkonzentration, endexpiratorischer Koh-

lendioxidpartialdruck, PEEP, Herzfrequenz, arterieller, pulmonalarterieller und zentraler Blutdruck, Herzminutenvolumen, Körperkerntemperatur und Urinausscheidung kontinuierlich überwacht.

Die Normovolämie wurde durch intravenöse Infusion von 38°C warmem Jonosteril (Fresenius, Bad Homburg) und 10% HAES (Fresenius, Bad Homburg) aufrechterhalten. Der Flüssigkeitsersatz erfolgte in Abhängigkeit vom zentralvenösen und systemischen arteriellen Druck, die möglichst konstant gehalten wurden. Das Spenderschwein erhielt 1l 10% HAES- und 2-4l Jonosterilinfusionen. Das Empfängerschwein erhielt 1l 10% HAES, 0,5-1l Jonosteril und 0,5-3,5l Vollblut vom Spendertier, wenn der Hb-Wert unter 5 g/dl abfiel. Bei einer Herzfrequenz $>160 \text{ min}^{-1}$ wurde Pindolol (Visken[®], Novartis Pharma, Nürnberg) abhängig vom Effekt auf den systemischen Blutdruck fraktioniert verabreicht.

Beim Empfängertier wurde vor dem Abklemmen der Gefäße zur Hepatektomie und dem passiven extrakorporalen Bypassanschluß mit 500 IE Heparin (Liquemin[®], Roche, Grenzach-Wyhlen) pro kg Körpergewicht intravenös antikoaguliert.

Bei geöffnetem Bypass sollte der arterielle Blutdruck nicht mehr als 10-15% sinken und der ZVD bei 12 mmHg bleiben. Es wurde je nach Bedarf fraktioniertes, auf 1:100.000 verdünntes Noradrenalin (Arterenol[®], Hoechst, Bad Soden am Ts.) injiziert. Vor Reperfusion der Vena portae erhielt der Empfänger 50-100 ml 8,4% Natriumbikarbonat nach vorheriger Blutgasanalyse, 500-1000 mg Methylprednisolon (Urbason[®] solubile forte 1000, Hoechst, Frankfurt), 100 mg Ranitidin (Sostril[®], Glaxo Wellcome-Cascan, Hamburg), 2 g Cefotiam (Spizel[®], Takeda, Aachen), 500 mg Metronidazol (Clont[®], Bayer Vital, Leverkusen) und je nach Bedarf Lidocain (Steigerwald, Darmstadt) oder Forusemid (Lasix[®], Hoechst, Bad Soden am Ts.).

Die Narkose wurde mit dem Wechsel der CMV-Beatmung zur CPAP-Beatmung während der Anastomose des Ductus choledochus beendet. Nach Beendigung der Bauchnaht und einer Kontrollphase von 30 min erfolgte bei einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 20% und beim Vorliegen von Spontanatmung die Extubation der Empfängertiere. Zur Antagonisierung der Fentanylwirkung wurden Naloxon (Schwabe-Curamed, Karlsruhe) und Physostigmin (Anticholium[®], Köhler, Alsbach-Hähnlein) appliziert.

2.2.4 Lebertransplantation

Die Explantation der Leber beim Spender und die Implantation beim Empfänger wurde, mit einigen weiter unten beschriebenen Modifikationen, nach der von Sir Roy Calne 1968 entwickelten Technik zur orthotopen Lebertransplantation beim Schwein durchgeführt⁶⁴. Der Operationsablauf bei der Schweinelebertransplantation entspricht in Hinblick auf die personellen Anforderungen, das Instrumentarium und die sterilen Kautelen im wesentlichen der Vorgehensweise bei der humanen Transplantationschirurgie. Alle Transplantationen wurden vom gleichen Chirurg durchgeführt. Zum Operations-

team zählten ein japanischer Gastchirurg, ein Assistent der Klinik, zwei Doktoranden und eine Operationsschwester zur Instrumentation.

Spendertiere

Es erfolgte eine mediane Oberbauchlaparotomie vom Processus xyphoideus bis caudal in Höhe der Harnblase. Der Situs wurde mit Hilfe eines großen Operationsrahmens eingestellt. Das Ligamentum falciforme, triangulare sinistrum und die retroperitoneale Vena Cava-Membran wurden durchtrennt. Nach Spaltung des Omentum minus wurden die supra und infrahepatische Vena cava mit einem Mersilenebändchen angechlungen. Es folgte die Präparation des Leberhilus. Die Arteria hepatica wurde bis zum Truncus coeliacus und seinem Ursprung aus der Aorta freipräpariert. Dabei wurden die Aa. gastrica sinistra und dextra abgesetzt und ligiert. Die Pfortader wurde von der Leberpforte bis hin zum Venenkonfluenz unterhalb des Pankreas dargestellt, um eine ausreichende Länge für die spätere Anastomose zu gewinnen. Um ebenfalls ein ausreichend langes Segment der suprahepatischen V. cava zu erhalten, wurde das Zwerchfell zirkulär mit einem 2 cm breiten Saum durchtrennt und das Gefäß bis zu seinem Eintritt in den rechten Vorhof dargestellt. Die Zwerchfellvenen wurden mit Durchstichligaturen verschlossen. Anschließend erfolgte die Unterbindung und Durchtrennung der A. cystica und des Ductus cysticus mit darauf folgender Cholecystektomie.

Durch Entblutung über die Katheter in der Arteria carotis communis und in der Vena jugularis externa wurde ein Herzstillstand bei dem Spender unter Fortführung der Narkose herbeigeführt. Das Blut wurde steril aufbewahrt, um es gegebenenfalls dem Empfänger tier transfundieren zu können. Nach Hepatektomie wurde die Spenderleber gewogen und entsprechend den Gruppen weiter behandelt.

Empfängertiere

Das chirurgische Vorgehen beim Empfängertier war für alle 6 Gruppen gleich. Die Empfängerleber wurde ähnlich wie beim Spendertier mobilisiert. Simultan wurde ein passiver veno-venöser Bypass vorbereitet. Der Bypass bestand aus drei sterilen Kathetern der Größe 20 bis 24 Ch. und einem Y-Stück. Zuerst wurde der Katheter am geraden Y-Stück in die zuvor freigelegte linke V. jugularis interna, ein weiterer Katheter in die Vena portae und zuletzt in die infrahepatische Vena cava inferior eingesetzt, abgeklemmt und entlüftet. Die suprahepatische Vena cava inferior wurde mit zwei Satinskyklemmen abgeklemmt. Vor Freigabe des Bypasses wurden dem Empfängertier 500 IE Heparin (Liquemin®) pro kg Körpergewicht appliziert. Anschließend erfolgte die Hepatektomie, hierbei wurden die Gefäße sowie der Ductus choledochus, anders als bei der Spenderoperation, dicht an der Leber durchtrennt.

Um die ischämische Phase des Transplantats zu minimieren, wurde nach Anastomose der suprahepatischen V. cava inferior die V. portae genäht, der Bypass abgeklemmt und die Perfusion freigegeben. Die ersten 150 bis 200 ml wurden bei geschlossener

Satinskyklemme über die infrahepatische V. cava inferior abgelassen und verworfen. Anschließend wurde die infrahepatische Vena cava inferior wieder abgeklemmt und die suprahepatische Vena cava inferior freigegeben. Es folgten die Anastomosen der infrahepatischen Vena cava inferior und anschließend der Arteria hepatica. Abweichend von Calnes Beschreibung, wurde die Anastomose nicht mit einem Carrell Patch auf die Aorta genäht, sondern End-zu-Seit mit 7.0 Prolene auf die Gabel der empfangenseitigen A. gastroduodenalis und A. hepatica communis. Hieraus leiten sich zwei entscheidende Vorteile ab: Es besteht nicht die Gefahr einer Verletzung des Ductus thoracicus, der beim Schwein $\frac{3}{4}$ der Zirkumferenz der Aorta einnimmt. Zweitens ist es nicht nötig, die Aorta mit den damit verbundenen hämodynamischen und ischämischen Konsequenzen für die Niere abzuklemmen. Nach der Anastomosierung der Arteria hepatica erfolgte die Gabe von 1 mg Protaminsulfat (Protamin®, ICN, Frankfurt am Main) pro 100 IE applizierten Heparins zur Antagonisierung der antikoagulativen Wirkung.

Zuletzt wurde der Ductus choledochus anastomosiert. Auf Grund seiner Größe beim Schwein bewährt sich eine End-zu-End-Anastomose. Bei der humanen Transplantation gibt es hingegen weniger Komplikationen bei einer Seit-zu-Seit-Anastomosetechnik⁶⁵. Die Transplantation war mit der Bauchnaht abgeschlossen. Um die Tiere keinem unnötigen Streß bei den täglichen postoperativen Blutentnahmen auszusetzen, wurden intraoperativ Katheter in die Vena jugularis interna und Arteria carotis communis platziert, die postoperativ mühelose Blutentnahmen erlaubten.

Postoperative Nachsorge

Nach Extubation wurden die Tiere in einem Käfig unter Infrarotstrahlern gehalten. Während der ersten 12 postoperativen Stunden wurde das jeweilige Tier kontinuierlich vom Operateur oder einem Assistenten intensivmedizinisch überwacht. Das intensivmedizinische Monitoring bestand in Online-Messungen des arteriellen und zentralvenösen Blutdrucks, Überwachung und Bilanzierung der Ausscheidung, stündlicher Durchführung von Blutgas- und Hb-Analysen sowie einer tierschutzgerechten Analgisierung. Ferner wurden Blutproben zur Serumanalytik nach 3, 6 und 12h entnommen. In Abhängigkeit von den Analysewerten wurde intravenös Jonosteril®, Vollblut, Kalium, Calcium und ggf. auch Furosemid verabreicht.

Die Tiere hatten vom ersten postoperativen Tag an freien Zugang zum Wasser. Futter erhielten sie ab dem zweiten postoperativen Tag. In den ersten drei postoperativen Tagen erfolgte eine Infektionsprophylaxe durch zweimal tägliche Infusionen von 2 g Cefotiam (Spizel®, Takeda Pharma, Aachen) und 500 mg Metronidazol (Clont®, Braun, Melsungen). Bei Verdacht auf eine Infektion (Körpertemperatur >39,5°C und Leukozytose) wurde die antibiotische Therapie nach dem dritten Tag fortgeführt. Die Gabe von 40 mg Omeprazol (Antra 20®, Astra, Wedel) zur Ulkusprophylaxe erfolgte täglich. Ab dem zweiten postoperativen Tag wurden die Tiere mit der intramuskulären Gabe von 2,5 mg Ciclosporin A (Sandimmun®, Sandoz SA, Basel, Schweiz) pro kg Körpergewicht immunsupprimiert. Die Tiere wurden durch intravenöse Applikation von Kalium-

chlorid und Thiopental (Trapanal[®], Byk Gulden, Konstanz) getötet. Anschließend erfolgte die Obduktion aller Tiere.

2.2.5 Untersuchungsprogramm

Probennahmen

Prä- und postoperative Blutentnahmen

Präoperativ erfolgte eine Blutentnahmen jeweils beim Spender- und Empfängertier über die Ohrvene. Intraoperativ und in den ersten Stunden nach Transplantation wurden kurz vor der portalvenösen Reperfusion, 15 min, 1h, 3h, 6h und 12h nach der portalvenösen Reperfusion beim Empfänger Proben entnommen. Die Blutentnahmen wurden über die intraoperativ platzierten Katheter in der Vena jugularis interna und der Arteria carotis communis durchgeführt. An den postoperativen Tagen erfolgten die Blutentnahmen täglich. Das Blut wurde in Monovetten abgenommen und im Zentrallabor untersucht. Für Spezialbestimmungen wurde das Blut einer weiteren Monovette mit 3000 min^{-1} zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und in zehn Eppendorf-Gefäßen pro Entnahme bis zur Bestimmung bei -80°C aufbewahrt.

Probennahmen während der extrakorporalen Leberperfusion

Während der extrakorporalen, normothermen Perfusion der Spenderleber wurden Proben simultan aus dem Perfusions- und Dialysekreislauf entnommen. Die Entnahmen aus dem Perfusionskreislauf erfolgten über einen 3-Wege-Hahn aus dem von der Vena cava inferior wegführenden Schlauch und aus dem Dialysekreislauf über einen 3-Wege-Hahn vor dem Reservoir. Die erste Perfusatprobe wurde vor dem Start der Dialyse genommen. Die nächste Probennahme folgte simultan aus Perfusat und Dialysat 15 min nach Anschluß der Dialyse, aber vor Leberanschluß. Nach Leberanschluß wurden Entnahmen nach 5, 15, 30, 60, 120, 180 und 240 min Leberperfusion durchgeführt. Das Perfusat wurde zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. Bis zur Bestimmung wurden die Perfusat- und Dialysatproben bei -80°C gelagert.

Viabilitätsparameter

Postoperative Bestimmungen im Serum

Aus den präoperativ von Spender- und Empfängertieren entnommenen Blut wurden die Ausgangswerte ermittelt. Die Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Bestimmungen der biochemischen Routineparameter wie Bilirubin, Gesamtprotein, Albumin, TPZ, PTT, Fibrinogen, Ammoniak, Harnstoff, Kreatinin, GOT, GPT, LDH und

alkalische Phosphatase erfolgten am gleichen Tag im Technicon DAX-System (Technicon Instruments Corporation, Tarrytown, New York, USA) im Zentrallabor der Charité, Campus Virchow-Klinikum.

Die Konzentration der α -Glutathion-S-Transferase (α -GST) wurde mit einem schweinespezifischen α -GST-ELISA-Testkit (Biotrin Hepkit™, Biotrin International, Dublin, Irland) bestimmt. Die Kreuzreaktivität zwischen humaner und porciner α -GST bei diesem quantitativen Enzymimmunoassay liegt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,69 $\mu\text{g/l}$. Der Test basiert auf einer Reaktion der α -GST mit biotinyliertem Antikörper (Anti-Schweine- α -GST-IgG-Antikörper), Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (HRP: horseradish peroxidase) und Anti-Schweine- α -GST-IgG-Antikörper. Die Extinktion der angesetzten Proben wurde an einem Photometer (Dynatech MR 5000, DPC Biermann GmbH, Bad Neuheim) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Hyaluronsäure wurde mit einem Radioimmunoassay bestimmt (Pharmacia HA Test, Uppsala, Schweden), der auf einem spezifisch Hyaluronsäure bindenden, mit ^{125}I -markierten Protein basiert. Das ungebundene ^{125}I -HABP wird abgetrennt und die Radioaktivität in einem γ -Counter gemessen. Die Meßwerte verhalten sich dabei umgekehrt proportional zu den Konzentrationen [$\mu\text{g/l}$] in den Proben.

Galleproduktion

Der Gallefluß ist ein empfindlicher und hoch signifikanter Parameter zur Beurteilung der Leberfunktion^{57,58}. Die Galleproduktion wurde während der extrakorporalen Perfusion der Gruppe 3 und 6 bestimmt. Hierzu wurde eine Heidelberger Verlängerung in den Ductus choledochus eingelegt und aus der Perfusionskammer heraus in ein separates Röhrchen mit Millilitereinteilung abgeleitet. Dadurch konnte die Galleproduktion kontinuierlich gemessen werden. Wegen der Abhängigkeit von der Leberzellmasse wurde die Galleproduktion zur besseren Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen auf 100 g Lebergewicht bezogen. Auf die Einlage einer T-Drainage nach Lebertransplantation zur Bestimmung der Galleproduktion wurde verzichtet. Durch die Aktivität der Schweine wurde das Risiko einer Dislokation oder Infektion mit den dadurch verbundenen Komplikationen als zu groß eingestuft.

Darstellung und Auswertung der Versuchsergebnisse

Alle gemessenen Werte werden in Form von Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Für die statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ definiert. Aus dem präoperativ vom Spender und Empfänger ($n=36$) entnommenen Blut wurden Ausgangswerte ermittelt. Postoperative Abweichungen wurden mit dem gepaarten t-Test bzw. Wilcoxon-Test untersucht. Für den Vergleich wiederholter Messungen für mehrere Wertegruppen gleichzeitig wurde eine Varianzanalyse mit paarweisem Vergleich von Mittelwerten (repeated measurement ANOVA) durchgeführt. Die Versuchsgruppen

1-6 untereinander wurden mit dem t-Test oder mit dem Mann-Whitney Ranksummentest verglichen. Für den Vergleich mehrerer Gruppen gleichzeitig für einen bestimmten Meßzeitpunkt wurde die Varianzanalyse (ANOVA) herangezogen.

Wenn eine Varianzanalyse einen signifikanten p-Wert ergab, wurden für die einzelnen Gruppen multiple Vergleiche gegen eine gewählte Kontrollgruppe (Gruppe 2) durchgeführt. Bei Vorliegen einer Normalverteilung waren dies der Bonferroni t-Test oder Dunnett's Test. Der Dunnett's Test und Dunn's Test sind die entsprechenden verteilungsfreien Verfahren. Die statistische Auswertung erfolgte in Kooperation mit dem Statistischen Institut der Freien Universität Berlin.

Komponente	Ausgangswerte	Referenzbereich
Natrium	137,8 ± 0,6	143 ± 3,9 mmol/l
Kalium	3,7 ± 0,1	5,3 ± 0,7 mmol/l
α-GST	8,5 ± 0,7	* µg/l
GOT	26 ± 1	14 - 50 U/l
GPT	23 ± 1	19 - 65 U/l
LDH	610 ± 18	480 - 740 U/l
γ-GT	22 ± 1	11 - 38 U/l
Alkalische Phosphatase	137 ± 4	90 - 145 U/l
Gesamtbilirubin	0,40 ± 0,03	0,3 ± 0,1 mg/dl
Kreatinin	1,3 ± 0,3	0,85 ± 0,16 mg/dl
Hyaluronsäure	232 ± 18	90 - 190 µg/l
Protein	5,0 ± 0,1	6,4 ± 0,5 g/dl
Albumin	2,60 ± 0,06	3,8 ± 0,4 g/dl
partielle Thromboplastinzeit (PTT)	30 ± 1	33,8 ± 0,4 s
Ammoniak	33 ± 1	30,5 ± 5 µmol/l
Harnstoff	19,0 ± 0,6	10,3 ± 3,2 mg/dl

Tabelle 4: Gemessene Ausgangswerte der Versuchstiere im Serum sowie die Referenzbereiche aus der Literatur⁶⁶⁻⁷³

* Literatur über den Referenzbereich der α-GST liegt für das Schwein bisher nicht vor, da wir erstmals die α-GST für das Schwein evaluiert haben.

2.2.6 NELP der Gruppen 3 und 6

Neuentwicklung des Leberperfusionssystems mit integrierter Dialyse

Während für die Perfusion von Schlachthoflebern nur auf keimreduzierte Bedingungen geachtet wurde, stellt die Transplantation einer extrakorporal perfundierten Leber höchste Anforderungen an die Sterilität. Des weiteren sollte, auf den in Teil I gewonnenen Erkenntnissen aufbauend, der Kreislauf um eine Dialyseeinheit erweitert werden. Aus diesen Gründen war es notwendig, ein neues Leberperfusionssystem zu entwickeln.

Das neue Perfusionssystem nutzt die Doppelkopfrölpumpen und Apparatekonsole, wie auch das Bedienungspanel aus der Geräteserie S3 der Firma Stöckert, München. Diese Komponenten finden Verwendung für Herz-Lungen-Maschinen und erfüllen somit höchste Sicherheitsanforderungen. Die Röllerkölpumpen wurden in langjähriger Entwicklungsarbeit für eine minimale Schädigung der korpuskulären Blutbestandteile optimiert, um einer Hämolyse entgegen zu wirken⁷⁴. Erstmals wurde in dieses System ein CAN-Bus (controller area network) eingearbeitet, der die einzelnen Komponenten auf digitalem Wege integriert und ein Online-Monitoring aller Pumpen inklusive der Drücke und Flüsse im Perfusionssystem ermöglicht. Für das Monitoring war es nötig, eine Software zu programmieren, deren Grundlage das Schalt- und Flußdiagramm des Perfusionskreislaufs war. Abbildung 7 zeigt hierzu ein Monitorbild, welches während der Perfusion auf einem Notebook angezeigt wurde. Es lassen sich somit die arteriellen und portalvenösen Widerstände ermitteln, auf einem Monitor anzeigen und über eine Änderung der Pumpgeschwindigkeiten die Flüsse direkt regeln.

Überwachung der Druck- und Flußregulation

Während der Perfusion sollte ein möglichst konstanter Fluß durch die Leber aufrecht erhalten werden⁶⁸. Die Flußmessung erfolgte jeweils an den Röllerpumpen. Insgesamt wurden sechs Röllerpumpen verwendet:

- arterieller Zufluß über die A. hepatica (Pumpe 3A)
- arterieller (Pumpe 2B) und venöser (Pumpe 2A) Zufluß über die Vena portae
- Fluß des Perfusats durch den Dialysator (Pumpe 3B)
- für das Dialysat (Dialysatpumpe)
- im Wasserkreislauf (Wasserpumpe)

Die Drücke der drei Blutgefäße wurden mit Druckaufnehmern in Hilushöhe kurz vor dem Durchtritt der Schläuche durch die halbmondförmige Durchtrittsplatte kontinuierlich gemessen. Die Blutflüsse wurden über die Drücke reguliert. Mittels übergeordneter Steuerung wurden leberspezifische Grenzdrücke für die Röllerpumpen so vorgegeben,

daß sich ein Blutfluß von 1 ml/min und g, bestehend aus dem arteriellen und portalvenösen Perfusat, ergab. Beim Überschreiten des Grenzdruckes während der Perfusion in Vena portae oder A. hepatica wurde die versorgende Pumpe (2A, 2B oder 3A) jeweils automatisch abgeschaltet, sofern der Grenzdruck nicht entsprechend verändert wurde.

Die Pumpen 2A und 2B arbeiteten voneinander abhängig im Master-and-Slave-Betrieb. Die den arteriellen Anteil fördernde Pumpe 2B war druckreguliert. Die den venösen Anteil fördernde Pumpe 2A war volumenreguliert und folgte mit der gleichen Perfusatmenge den Vorgaben der Pumpe 2B.

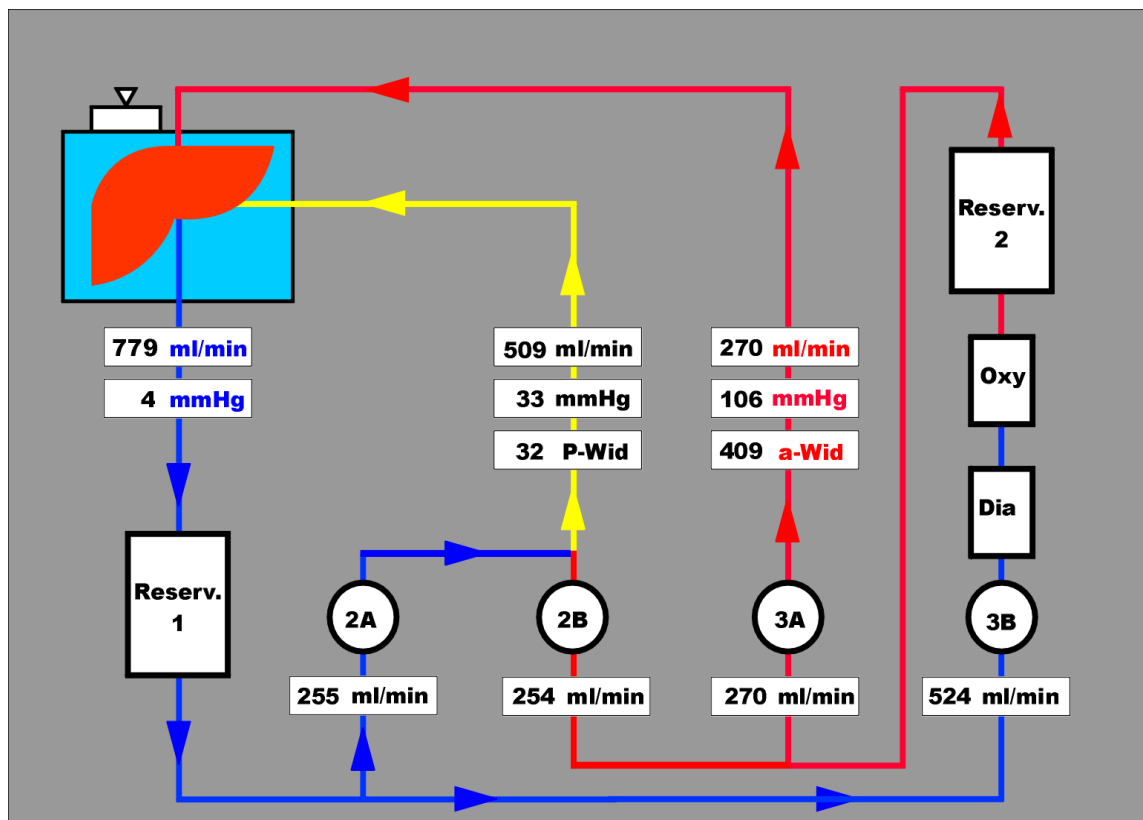


Abbildung 7: Dargestellt ist das Monitorbild vor Beginn der Perfusion. Blau korrespondiert mit dem venösen Perfusat, rot mit dem arterialisierten Perfusat. Die Farbe Gelb weist darauf hin, daß das in die V. portae gepumpte Perfusat gemischtvenös war. Die Kästchen zeigen online die Flüsse in ml/min, Drücke in mmHg und den berechneten Widerstand in p/V an.

An der Regulation war des weiteren das Reservoir 1 mit kapazitivem Niveauregler beteiligt. Durch den Niveauregler wurde der Pegel im Reservoir 1 konstant gehalten. Das Unterschreiten der vorgegebenen Füllmenge von 1400 ml Perfusat in Reservoir 1 wurde am Monitor angezeigt. Bei vollständiger Entleerung der Reservoire wurde Pumpe 3B am abführenden Schenkel automatisch abgeschaltet, um ein Ansaugen von Luft in

die Leber zu verhindern. Eine Höhenverstellung der Reservoirs führt zu gleichsinnigen Änderungen der Ausflußdrucke der zuführenden Schläuche aus der Vena cava inferior und des Abflusses aus dem Membranoxygenator.



Abbildung 8: Neu entwickelte Leberperfusionsmaschine auf einer rollbaren Konsole mit integriertem Akku. Von links nach rechts: Perfusionskammer, Gasflußmeßgerät, Flügelzellenpumpe für den Perfusionskammerdruck, Notebook und Bedienpanel.



Abbildung 9: Die Detailaufnahme der Perfusionsmaschine zeigt von links nach rechts Wasser und Dialysatbehälter, Wärmetauscher, Dialysator und den Membranoxygenator

Perfusionskammer und Drucksoszillation

Als ein wesentlicher Bestandteil wurde die von Neuhaus⁴³ entwickelte flüssigkeitsgefüllte, geschlossene Perfusionskammer übernommen. Vor dem Einlegen der Leber, geschützt durch einen Kunststoffbeutel, wurde die Perfusionskammer über ein PVC-Schlauchsystem mit 4 Ventilen und einer Rollerpumpe aus zwei 10l-Kanistern zur Hälfte mit Wasser aufgefüllt. Je nach Ventilstellung kann Wasser in die Perfusionskammer hinein- oder abgepumpt werden. Das Gewicht der Kanister wurde kontinuierlich gemessen. Zu Beginn jeder Perfusion wurde die Kammer mit 15l 37°C warmem Wasser nahezu vollständig gefüllt. In diesen Kreislauf war ein Wärmeaustauscher (720 Helios, Dideco, Mirandola, Italien) integriert. Es war keine Sterilität des Wasserkreislaufs erforderlich, da kein direkter Kontakt zu Perfusat und Leber bestand.

Auf dem Kammerdeckel befand sich eine weitere Kammer (5x10x10 cm), die während der Perfusion zur Hälfte mit Luft gefüllt blieb. Über eine Flügelzellenpumpe (Luftpumpe, Firma Brey, Memmingen) wurde die Luft zur Erzeugung der Kammerdrucke angesaugt und wieder abgeführt. Die sinusförmigen Druckwellen hatten eine Amplitude von

15 mmHg und eine Schwingungsfrequenz von 6 min^{-1} , sie oszillierten um einen Mitteldruck von 9 mmHg. Diese Druckoszillationen ahmen die Atemexkursionen und die damit im Abdomen verbundenen Druckschwankungen nach.

Damit das Volumen des Kammerinhalts auch bei Änderungen des Lebervolumens konstant blieb, wurde der Pegelstand in der Kammer mit Hilfe eines optischen Weggebers ständig kontrolliert und bei einem An- oder Absteigen eine entsprechende Wassermenge ab- beziehungsweise hinzu gepumpt. Dadurch konnten die Drücke in der Kammer und die Druckoszillationen konstant gehalten werden. Am Ende der Perfusion wurde das Wasser vor Öffnung der Kammer und Entnahme der Leber abgepumpt.

Wie nachgewiesen werden konnte, wird mit dieser Perfusionskammer ein verbessertes Perfusionsergebnis erzielt, insbesondere in der Läppchenperipherie. Die portalvenösen Lumina folgen den künstlichen intraabdominellen Druckschwankungen. Durch die schwimmende Aufhängung der Leber wird die Ausbildung von Druckstellen und hypoperfundierten Leberarealen, wie sie durch das Eigengewicht der Leber unweigerlich entstehen, vermieden⁴⁴.

Dialysekreislauf und Oxygenierung

In einem separaten, von den im Leberperfusionssystem vorherrschenden Drücken und Flüssen unabhängigen Kreislauf wurde ein Dialysator integriert. Dieser Faser Dialysator NT 1375 (Spiraflo, Sorin Biomedica, Saluggia, Italien) verfügt über eine effektive Oberfläche von $1,35 \text{ m}^2$. Mit je einer Rollerpumpe wurden 300 ml Dialysat pro Minute über einen Wärmeaustauscher (720 Helios, Dideco, Mirandola, Italien), der es auf 37°C anwärmte, und Perfusat in Abhängigkeit vom Gesamtblut durch den Dialysator gepumpt.

Um möglichen Volumenverschiebungen zwischen Dialysat und Perfusat vorzubeugen, wurde das Dialyse-Reservoir auf einer Waage während der Perfusion gewogen. Durch Regulierung der Dialysatflüsse wurde einem Flüssigkeitsübertritt zwischen beiden Kreisläufen entgegen gewirkt, so daß die Gesamtbilanz zwischen Perfusat und Dialysatvolumen ausgeglichen blieb. Ein Austausch des Dialysats wurde nicht vorgenommen. Das dialysierte Perfusat wurde zum Membranoxygenator (Module 1500, Stöckert, München) gepumpt. Die Oxygenierung erfolgte dort mit einem Gemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid (Carbogen, 400 ml/min). Das oxygenierte Perfusat wurde anschließend in ein weiteres Reservoir geleitet (Venomicard 752, Dideco, Mirandola, Italien). Aus diesem 1400 ml fassenden Reservoir 2 wurde, entsprechend dem Zufluß, das Perfusat je zur Hälfte über jeweils eine Rollerpumpe in die Vena portae und die Leberarterie gepumpt. Folglich wurde die Leber über die Arterie mit oxygeniertem Perfusat und über die Vena portae mit Mischblut bestehend aus zwei Dritteln venösem und einem Drittel arteriellem Blut versorgt. Die O_2 -Sättigung der Vena portae betrug 70-80%. Die Perfusionsschläuche bestanden aus Silikon mit einem Innendurchmesser von 1,4 Zoll. Das komplette Perfusionsset wurde nach den für die Herzchirurgie bestehenden Anforderungen vorgefertigt und sterilisiert.

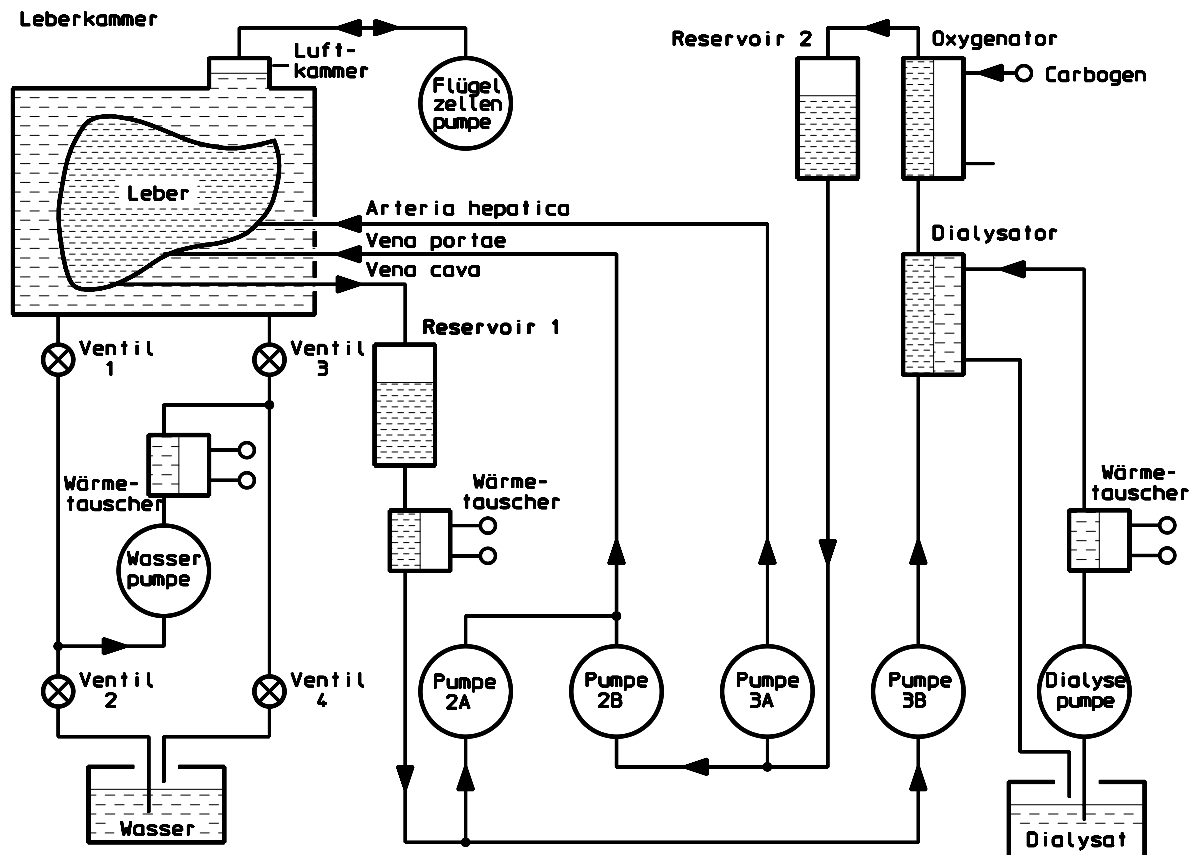


Abbildung 10: Schema des Perfusionssystems

Perfusat, Dialysat und Perfusion

Für alle Perfusionen wurde Perfusat auf der Basis von Vollblut benutzt. Das Vollblut stammte aus dem Penrose Schlachthof in Eberswalde, Brandenburg, und wurde frühmorgens am Versuchstag geholt. Nach Betäubung durch Elektroschock und Ankopeln des Schweins an die Transportschiene wurde die Halsregion abgespritzt und sterilisiert. Die Halsgefäße wurden durchtrennt und das Blut über einen sterilen Trichter in einem sterilen 5l-Kanister aufgefangen. Zur Antikoagulation wurden pro Liter 500 IE Heparin zugegeben. Anschließend erfolgte der Transport ins Forschungshaus der Charité, Campus Virchow-Klinikum.

2,5l Blut wurden durch Zugabe von 1,5 l Jonosteril auf eine Hämoglobinkonzentration von 10-11 g/dl eingestellt. Das Gesamtvolumen des Perfusats betrug 4l.

Die Ausgangswerte der untersuchten Parameter sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben und wurden aus dem für die Perfusion der Gruppen 3 und 6 verwendeten Vollblut ermittelt.

Komponente	Ausgangswerte	
Natrium	141 ± 2	mmol/l
Kalium	6,3 ± 0,4	mmol/l
α-GST	15 ± 12	µg/l
GOT	26 ± 4	U/l
GPT	18 ± 2	U/l
LDH	681 ± 125	U/l
γ-GT	24 ± 4	U/l
AP	103 ± 12	U/l
Gesamtbilirubin	0,23 ± 0,04	mg/dl
Harnstoff	26 ± 3	mg/dl
Kreatinin	1,4 ± 0,1	mg/dl
Protein	5,1 ± 0,4	g/dl
Albumin	2,9 ± 0,2	g/dl
Hyaluronsäure	105 ± 16	µg/l
Ammoniak	211 ± 32	µmol/l
Osmolalität	292 ± 4	mosm/kg
Leukozyten	13 ± 1	/nl
Thrombozyten	246 ± 28	/nl
Hb	9,6 ± 0,7	g/dl
Hkt	31 ± 2%	

Tabelle 5: Ausgangswerte im Perfusat

Zur Dialyse wurde ein Dialysat auf Basis eines Natriumbikarbonatpuffers verwendet (Schiwa Combi-Pac) bestehend aus 9000 ml Basislösung zur Bikarbonat-Hämodilution (SH 44-HEP) und 320 ml Natriumhydrogenkarbonat-Lösung 8,4%.

Komponente	SH 44-HEP	8,4%-NaHCO ₃	Gesamtdialysat
Na ⁺	109,50 mmol/l	1000 mmol/l	140,1 mmol/l
K ⁺	2,08 mmol/l		2,0 mmol/l
Ca ²⁺	1,81 mmol/l		1,7 mmol/l
Mg ²⁺	0,52 mmol/l		0,5 mmol/l
Cl ⁻	116,24 mmol/l		112,2 mmol/l
Laktat	3,00 mmol/l		2,9 mmol/l
Glucose	5,80 mmol/l		5,6 mmol/l

Tabelle 6: Ausgangswerte des Dialysats

Vor Beginn der Leberperfusion wurde ein Priming des Perfusionssystems mit 3l Jonosteril, 50 ml Humanalbumin (Humanalbumin N 20%, Bayer, Leverkusen) und 25.00 IE Heparin (Liquemin®, Roche, Grenzach-Wyhlen) durchgeführt. Die 15 bis 30 min dauernde Spülung sollte eventuelle Fertigungsrückstände aus dem Schlauchsystem entfernen und ein Absetzen von Blutbestandteilen an den Schlauchinnenflächen während der Perfusion verhindern. Nach Ablassen der Priming-Lösung wurde das Reservoir 1 mit Perfusat aufgefüllt, das Perfusat oxygeniert und der Dialysekreislauf gestartet. Durch 20 minütigen Betrieb ohne Leberanschluß wurde eine Äquilibration zwischen Perfusat und Dialysat ermöglicht. Parallel hierzu wurde die Perfusionskammer mit 37°C warmem Wasser gefüllt, so daß die Perfusionsapparatur für den Leberanschluß bereit stand.

Die Perfusion der Leber wurde nach vier Stunden beendet. In zwei Fällen mußte aus logistischen Gründen die Perfusionsdauer auf 5 Stunden verlängert werden. Nach Pumpenhalt wurde das Wasser aus der Perfusionskammer abgelassen, der Deckel geöffnet und die Leber unter sterilen Bedingungen aus der Perfusionskammer herausgenommen. Nach Entfernen der in den Gefäßen platzierten Spiralen und Schläuche wurde die Leber in den Operationssaal transportiert und umgehend in das vorbereitete Empfängertier transplantiert.

Bestimmung in Perfusat und Dialysat

Neben α -GST, GOT, GPT, LDH, γ -GT, Alkalische Phosphatase, Gesamtbilirubin, Hyaluronsäure, Proteine, Albumin, TPZ, PTT, Fibrinogen, Ammoniak, Harnstoff und Kreatinin wurden Natrium, Kalium, Hämoglobin und die Leukozytenzahl im Perfusat bestimmt. Diese Parameter wurden nach Anschluß der Dialyse, aber vor Leberperfusion sowie am Ende der Leberperfusion ebenfalls im Dialysat zur Überprüfung der Dialysierbarkeit dieser Parameter bestimmt. Zu den anderen Abnahmezeitpunkten wurden im Dialysat ausschließlich Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff und Ammoniak ermittelt.

2.2.7 Licht- und Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Entnahme der Biopsien/Biopsieprotokoll

Die Biopsien wurden mit einem Skalpell durch Keilexzision gewonnen. Die Exzision erfolgte immer an einer peripheren Spitze eines der vier Leberlappen mit makroskopisch für die gesamte Leber charakteristischem Aussehen. Die Biopsiestelle wurde anschließend sorgfältig elektrokoaguliert. Da die morphologischen Untersuchungen späterer Zeitpunkte mit kumulierten Einflüssen und reaktiven Spätfolgen nicht Gegenstand dieser Untersuchung waren, wurden nur die Biopsien 0-3 entsprechend dem beschriebenen Protokoll bearbeitet. Biopsie 4 wurde im Rahmen der Obduktion lichtmikroskopisch untersucht.

Biopsie-Nummer	Abnahmezeitpunkte
0	Sofort nach Öffnung des Abdomens des Spenders
1	Nach Vorbereitung des Abdomens des Spenders
2	5min nach Reperfusion im Empfänger
3	6 min nach Reperfusion
4	Nach Exitus

Tabelle 7: Biopsien der Gruppen 1-4

Biopsie-Nummer	Abnahmezeitpunkte
0	Sofort nach Öffnung des Abdomens des Spenders
1	Nach Vorbereitung des Abdomens des Spenders
2a	Nach einer Stunde warmer Ischämie im Situs des Spenders
2	5min nach Reperfusion im Empfänger
3	6 min nach Reperfusion
4	Nach Exitus

Tabelle 8: Biopsien der Gruppe 5 und 6

Exemplarisch für alle sechs Gruppen ist das Biopsie-Schema anhand eines Zeitstrahls der Gruppe 6 in der folgenden Abbildung 11 dargestellt.

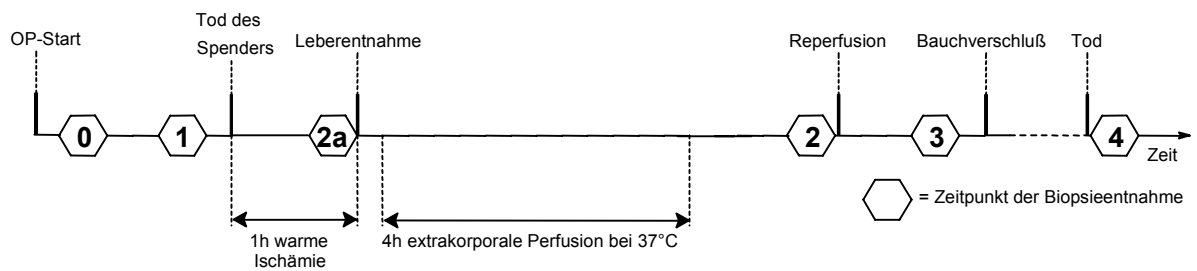


Abbildung 11: Darstellung des Zeitstrahls am Beispiel der Gruppe 6. Von allen ausgewerteten Biopsien wird nur die Biopsie 3 in alle 6 Gruppen und die Biopsie 2 zusätzlich in den Gruppen 3 und 6 dargestellt.

Die Biopsie 0 wurde sofort nach Öffnung des Abdomens entnommen. Nach der Leberpräparation und dem Vorbereiten des Abdomens für die Explantation wurde die Biopsie 1 entnommen. Nach Herzstillstand wurde die Leber nach einer Stunde warmer Ischämie aus dem Abdomen des Spenders entnommen und auf dem Backtable für die Perfusion vorbereitet. Der Zeitpunkt der Biopsie 2a war genau nach einer Stunde warmer Ischämie. Nach vier Stunden normothermer extrakorporaler Perfusion in der Maschine wurde die Perfusion beendet und die Leber in das vorbereitete, hepatektomierte Abdomen des Empfängers orthotop plziert. Nach Fertigstellung der Anastomosen der suprahepatischen Vena cava inferior und der Vena portae wurde die Biopsie 2 kurz vor Reperfusion der Leber entnommen. Nach Fertigstellung der übrigen Anastomosen und erfolgter Reperfusion wurde kurz vor Bauchverschlus die Biopsie 3 entnommen. Die Schweine verbrachten die postoperative Zeit in Einzelställen. Für die Entnahme der Biopsie 4 wurde das Abdomen so schnell wie möglich nach Exitus des Tieres eröffnet und die Leber biopsiert.

Fixierung der Biopsien

Die Leberbiopsien wurden mit einer Rasierklinge in gleich große Stücke mit gerader Schnittfläche geteilt. Jeweils ein Stück wurde in Paraformaldehyd (Formalin, Herbeta, Berlin) für die Lichtmikroskopie fixiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt. Ein weiteres Stück wurde in vier kleinere Stücke mit einer Kantenlänge von ungefähr 1,5 mm geteilt und in 5%-igem Glutaraldehyd (Bioproducts, Boehringer, Heidelberg) für die Elektronenmikroskopie fixiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Zeit zwischen Entnahme und Fixierung in Glutaraldehyd betrug weniger als eine Minute. Glutaraldehyd ist in einem relativ breiten Konzentrationsbereich für die Ultradünnschnitttechnik als sicheres Fixativ gebräuchlich^{75,76}.

Präparationsmethoden für die Lichtmikroskopie

Fixierung, Einbettung und Färbung

Die in Paraformaldehyd fixierten Gewebeproben wurden für die Lichtmikroskopie verwendet. Die Einbettung erfolgte in Paraffin. Zuerst wurde die Gewebeprobe mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, anschließend der Alkohol durch Behandlung mit Xylol (E.Merck, Darmstadt) und später mit einer Mischung aus weichem Paraffin und Xylol (Verhältnis 1:1) entfernt. Die Gewebeprobe wurde dann bei 56-58°C mit Paraplast (Sherwood – Medical, St.Louis, USA) durchtränkt und in Ausgußformen zum Erstarren gebracht. Mit einem Schlittenmikrotom (Leica SM2000R) wurden von diesen Blöcken Präparate mit einer Schnittdicke von 1-1,5 µm angefertigt.

Drei Färbungen wurden routinemäßig verwendet:

- Hämatoxylin-Eosin-Färbung
- Masson-Goldner-Färbung
- PAS-Färbung nach Hotchkiss und McManus

Dokumentation der Lichtmikroskopie

Für die Bilddokumentation der lichtmikroskopischen Befunde wurde neben den Semidünnschnittpräparaten die Masson-Goldner-Färbung ausgewählt, da diese die bindegewebige Lämpchenarchitektur gut darstellt. Im Ergebnisteil wurde oben auf der Seite der Schnitt gefärbt nach Masson-Goldner und direkt darunter der Semidünnschnitt angeordnet. Auf der darauffolgenden Seite findet sich die elektronenmikroskopische Abbildung. Die Präparate wurden mit Hilfe eines Mikroskops (Leica DMRBE) photographiert. Verwendet wurde ein Kunstlicht Diafilm (Ektachrom 160T, Kodak). Die Vergrößerung auf dem Diapositiv berechnet sich nach der vom Hersteller für das oben genannte Mikroskop angegebener Formel: Objektivvergrößerung x Tubusfaktor x Einstellung des Vario-Okulars x Kamerafaktor.

Die Photoabzüge wurden formatfüllend angefertigt.

Zur Beschreibung der morphologischen Befunde wurde im Ergebnisteil wegen der leichteren morphologischen Zugänglichkeit auf das Kiernan-Lämpchen-Schema Bezug genommen⁷⁷, während in der Diskussion wegen der besseren Bezugnahme auf pathophysiologische Vorgänge auf das Rappaport-Schema⁷⁸ zurückgegriffen wurde.

Präparationsmethoden für die Elektronenmikroskopie

Fixierung, Kontrastierung und Nachfixierung

Die Gewebeproben für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden kurz nach Biopsieentnahme in 5%-igem Glutharaldehyd in 1/15 M Phosphatpuffer (E.Merck, Darmstadt) bei einem pH von 7,3 mindestens einen Tag bei 4°C fixiert und aufbewahrt. Für die Kontrastierung wurde eine Osmiumtetroxyd-Lösung zugefügt. Diese bedingt eine Anreicherung von Schwermetallen im Gewebe, was eine Zunahme der Elektro-

nenabsorption zur Folge hat und für die Bilderzeugung im Elektronenmikroskop unerlässlich ist. Zwei Stunden wurden die Gewebestücke in 2%-igem Osmiumtetroxyd, 4%-iges Osmiumtetroxyd (Paesel und Lorei, Hanau) in 1/15 M Phosphatpuffer verdünnt, bei Raumtemperatur belassen und anschließend mit Phosphatpuffer gespült. Die vernetzende Wirkung von Glutaraldehyd auf Proteine führte in Kombination mit einer stabilisierenden Nachfixierung mit Osmiumtetroxyd zu einem akzeptablen Erhaltungszustand der Zellen^{79,80}.

Einbettung

Die Gewebestücke wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (E.Merck, Darmstadt), jeweils zweimal 10 min in 70%-igem, 90%-igem und absolutem Alkohol, entwässert. Anschließend folgte die Entfernung des Alkohols durch das Intermedium Azeton (E.Merck, Darmstadt). Zuerst wurde das Gewebestück zweimal für 10 min in Azeton und im zweiten Schritt für 30 min in ein Azeton-Araldit-Gemisch (im Verhältnis 1:1) gelegt. Die Infiltration erfolgte mittels Araldit (Serva, Heidelberg) für mindestens zwei Stunden, bestehend aus 50% Harz, 47% Härter, 1% Weichmacher und 2% Beschleuniger. Danach wurden die Gewebestücke in BEEM-Kapseln (W.Plano, Marburg), gefüllt mit Araldit, überführt und bei 60°C mindestens 24 Stunden polymerisiert. Nach der Polymerisation wurden die BEEM-Kapseln von den Blöcken getrennt. Diese Vorgehensweise wird in der Elektronenmikroskopie üblicherweise angewendet, da sich ein hoher Wassergehalt der Gewebeproben nicht mit dem nötigen Hochvakuum des Elektronenmikroskops verträgt.

Herstellung der Semidünnschnitte

Für das Anfertigen der Semidünnschnitte wurden Glasmesser gebrochen und an der Messerkante mit Auffangtrögen (Alu-Band) versehen. Dann wurden die einzelnen Blöcke vorgetrimmt und mittels der Glasmesser mit einem Mikrotom (Leica RM 2065) von diesen Blöcken 0,5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Shandon GmbH, Frankfurt) aufgetragen, für 3-5 Sekunden auf einer Heizplatte bei 120°C gestreckt, anschließend bei 80°C auf einer Heizplatte getrocknet (ungefähr 15 Minuten) und bei 120°C auf einer Heizplatte 15 Minuten angeklebt. Danach wurden sie bei 80°C für 90 Sekunden mit Toluidinblau (Chroma 1%-ig in Natriumkarbonat 2,5-ig, Chroma-Gesellschaft, Köngen) angefärbt, abgewaschen und trocken mit einem Deckglas versehen.

Herstellung der Ultradünnschnitte und Nachkontrastierung

Nach Anspitzen der ausgewählten Blöcke wurden die Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von 60-65 nm am Mikrotom (Leica Ultracut S) angefertigt. Dazu wurde ein Diamantmesser (Dilaware Diamond Knives, Wilmington, USA) verwendet. Auf Kupferschlitzobjektträgern, 3 mm Durchmesser, 1x2 mm Schlitzgröße (BAL-TEC, Walluf) mit

Piloform (W.Plano, Marburg) 0,5%-ig in Chloroform befilmt, wurden die Schnitte nach dem Strecken mit Xylol aufgebracht. Die Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte diente der Verstärkung des Kontrastes und erfolgte in zwei Schritten, zuerst mit 5%-igem Uranylacetat (E.Merck, Darmstadt) in 50%-ig Ethanol für 15 min und dann mit Bleicitrat (E.Merck, Darmstadt) für 10 min nach Reynolds ⁸¹. Beide Stoffe verhalten sich synergistisch.

Dokumentation der Transmissionselektronenmikroskopie

Als Ergebnis der elektronenmikroskopischen Untersuchung entsteht ein Schwarzweißbild, auf dem das Präparat infolge der unterschiedlichen Durchdringung des Elektronenstrahls durch die verschiedenen dichten Strukturen in verschiedenen Grautönen bis Schwarztönen dargestellt wird. Je weniger die Elektronen in einer Schicht absorbiert werden, desto schwärzer wird diese abgebildet. Die Untersuchung und Dokumentation der Präparate wurde am Transmissionselektronenmikroskop (ZEISS EM 10) vorgenommen. Nach der allgemeinen Begutachtung des Präparates wurden Serienaufnahmen in für das Präparat charakteristischen Regionen angefertigt. Dabei wurde zwischen der perizentralen und der periportal Region des Leberläppchens unterschieden.

Selektion der Biopsien für die Transmissionselektronenmikroskopie

Von allen Kunststoffblöcken für die TEM wurden Semidünnschnitte angefertigt, die Präparate begutachtet und photographiert (Leica DMRBE). Für die Dokumentation wurde ein Agfapan-Film (APX 25, AGFA) verwendet. Die Photoabzüge wurden formatfüllend angefertigt. Die Synopsis der lichtoptischen Befunde an den Paraffin- und Semidünnschnitten war Basis für die Auswahl ultrastrukturell zu bearbeitender Gewebeareale. Die Photoabzüge ermöglichten ein exaktes Anspitzen der Blöcke in Abstimmung mit der Läppchenstruktur der Leber für das Anfertigen der Ultradünnschnitte und vereinfachten die Orientierung am Präparat im Elektronenmikroskop.

Für die lichtmikroskopischen Abbildungen errechnete sich eine Vergrößerung von 100-fach für die elektronenmikroskopischen Abbildungen von 4500-fach.

3. ERGEBNISSE

3.1 Evaluierung der Perfusatdialyse während NELP

3.1.1 Makroskopischer Aspekt der Lebern nach Perfusion

Innerhalb von 10 min nach Anschluß an die Perfusionsapparatur nahmen die Lebern eine rosa Färbung an. Weniger gut perfundierte Areale, durch eine dunkelrote bis violette Färbung gekennzeichnet, verloren sich innerhalb dieses Zeitintervalls. Ein Unterschied zwischen dem makroskopischen Erscheinungsbild der beiden Gruppen konnte nicht festgestellt werden.

3.1.2 Elektrolytkonzentrationen und pH-Werte im Vergleich

Natrium

Die Natriumkonzentration im Perfusat beider Gruppen lag zwischen 142 und 145 mmol/l und damit im Referenzbereich. Im Dialysat der Gruppe 2 stieg die Natriumkonzentration von 140 ± 1 mmol/l auf 143 ± 1 mmol/l an (Abbildung 12). Die Konzentrationsänderungen während der Perfusion waren in keiner Gruppe statistisch signifikant.

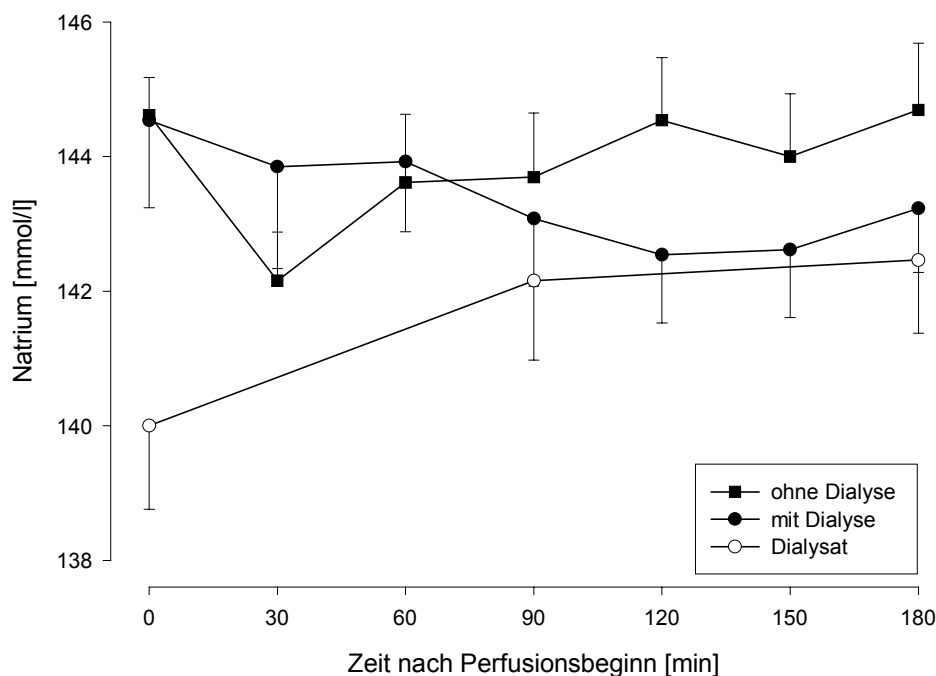


Abbildung 12: Die Natriumkonzentrationen im Perfusat der Gruppen 1 und 2 unterschieden sich nicht signifikant während der dreistündigen Perfusion. Die Natriumkonzentration im Dialysat von Gruppe 2 erhöhte sich leicht von 140 auf 142 mmol/l.

Kalium

In Gruppe 1 erhöhte sich die Kaliumkonzentration im Perfusat nach 30 min von $5,0 \pm 0,1$ auf $6,8 \pm 0,6$ mmol/l und nach 180 min weiter bis auf $7,9 \pm 0,7$ mmol/l. In Gruppe 2 kam es zu einer geringen Abnahme der Kaliumkonzentration im Perfusat von $5,0 \pm 0,1$ auf $4,8 \pm 0,5$ mmol/l nach 30 min. Ein stabiles Niveau der Kaliumkonzentration wurde mit $4,1 \pm 0,2$ mmol/l nach 60 min erreicht. Dieser Wert, wie auch die folgenden lagen damit weiterhin im Referenzbereich. Im Dialysat der Gruppe 2 stieg Kalium vom Ausgangswert mit $3,0 \pm 0,1$ mmol/l auf $4,0 \pm 0,2$ mmol/l nach 180 min an und erreichte damit das Konzentrationsniveau des Perfusats. Zu allen Zeitpunkten nach Perfusionsbeginn unterschieden sich die Kaliumkonzentrationen im Perfusat beider Gruppen signifikant ($p=0,004$ für $t=30$ min und $p<0,0001$ für $t>30$ min). Die Standardabweichungen der Kaliumkonzentration im Perfusat waren in Gruppe 1 höher als in Gruppe 2. Ein weiterer Unterschied bestand in der im Verlauf der Kaliumkonzentration: während in Gruppe 1 ein kontinuierlicher Anstieg gemessen wurde, war die Kaliumkonzentration in Gruppe 2 nach 60 Minuten praktisch konstant (Abbildung 13). Dies hatte Auswirkungen auf die Kaliumbilanz.

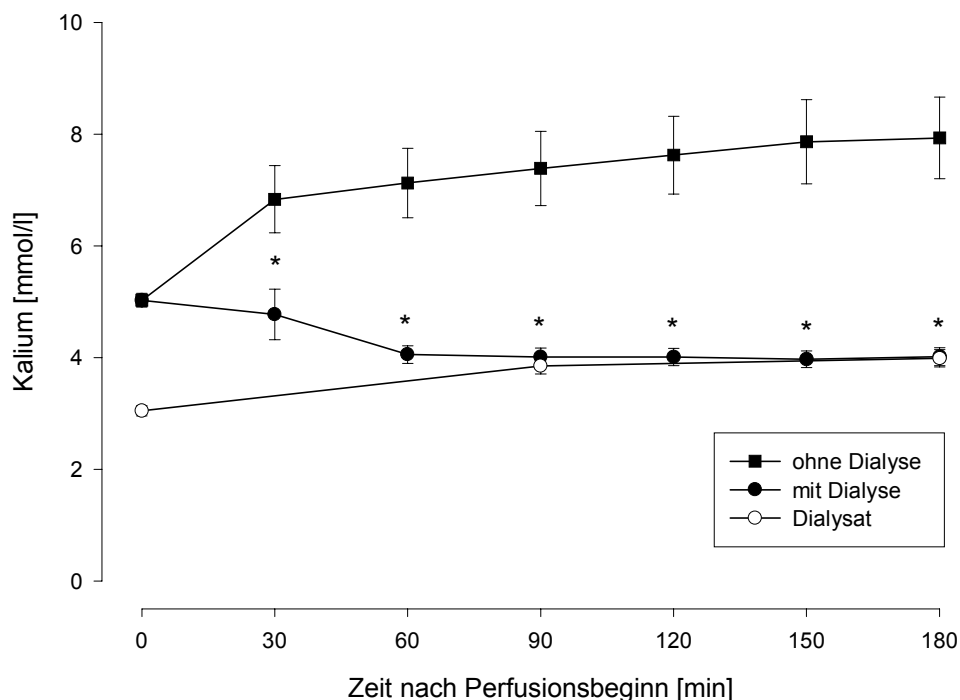


Abbildung 13: Es wurde ein Konzentrationsanstieg für Kalium im Perfusat der Gruppe 1 und eine Konzentrationsabnahme für Gruppe 2 ($p=0,004$ für $t=30$ min und $p<0,0001$ für $t>30$ min) gemessen. Im Dialysat von Gruppe 2 erhöhte sich die Kaliumkonzentration während der dreistündigen Perfusionszeit von 3 auf 4 mmol/l.

Der Gesamtgehalt an Kalium, einschließlich des Kaliums im Dialysat der Gruppe 2, stieg in beiden Gruppen über den Ausgangswert im Perfusat an. In Gruppe 1 wurden in den ersten 90 min der Perfusion $10,6 \pm 3,1$ mmol Kalium, im Gegensatz zu $3,4 \pm 2,0$ mmol in Gruppe 2 freigesetzt. Mit einer Menge von $13,1 \pm 3,4$ mmol Kalium in Gruppe 1 im Verlauf der gesamten Perfusion lag die Freisetzung damit signifikant über der in Gruppe 2 mit $4,9 \pm 2,2$ mmol ($p < 0,05$) (Abbildung 14).

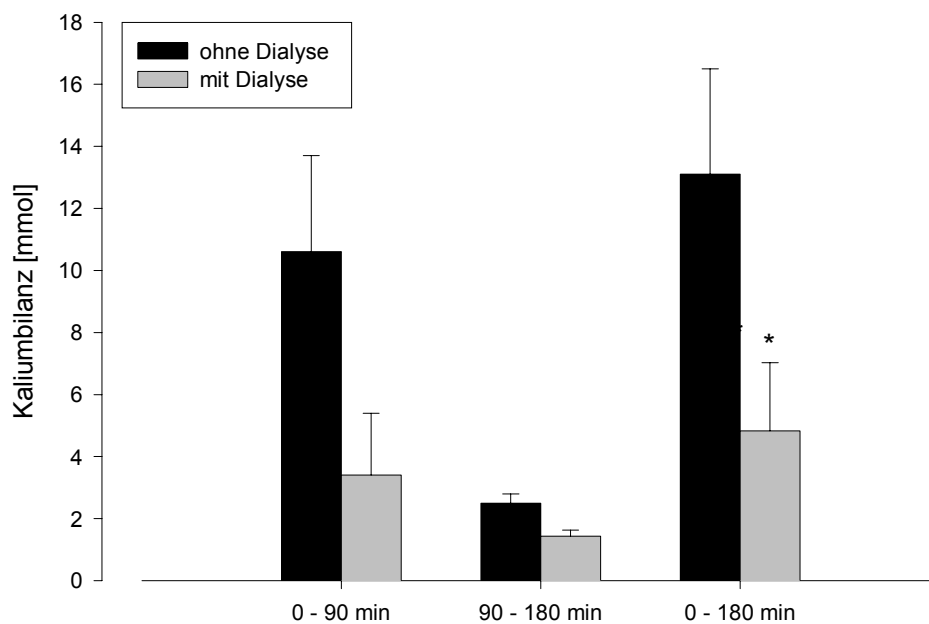


Abbildung 14: Die Kaliumfreisetzung während der Perfusion lag in Gruppe 1 zwischen Beginn und der 90sten Minute und zwischen der 90sten bis 180sten Minute über der von Gruppe 2. In der Gesamtbilanz wurde in Gruppe 1 signifikant mehr Kalium freigesetzt als in Gruppe 2.

pH-Werte

In Gruppe 1 fiel der pH-Wert von $7,40 \pm 0,09$ in den ersten 30 min der Reperfusion auf $7,06 \pm 0,05$. Im weiteren Verlauf sank der pH-Wert weiter bis auf $6,86 \pm 0,04$ nach 180 min. In Gruppe 2 nahm der pH-Wert im Perfusat von $7,40 \pm 0,06$ auf $7,24 \pm 0,02$ nach 30 min ab und stieg im weiteren Verlauf wieder auf Werte von $7,32 \pm 0,02$ nach 90 min und $7,35 \pm 0,02$ nach 180 min an. Im Dialysat der Gruppe 2 fiel der pH-Wert von $7,46 \pm 0,01$ auf $7,31 \pm 0,02$ nach 90 min und betrug nach 180 min $7,33 \pm 0,03$. Insgesamt zeigte sich im direkten Vergleich beider Gruppen zu jedem Zeitpunkt nach Perfusionsbeginn ein signifikanter Unterschied (Abbildung 15).

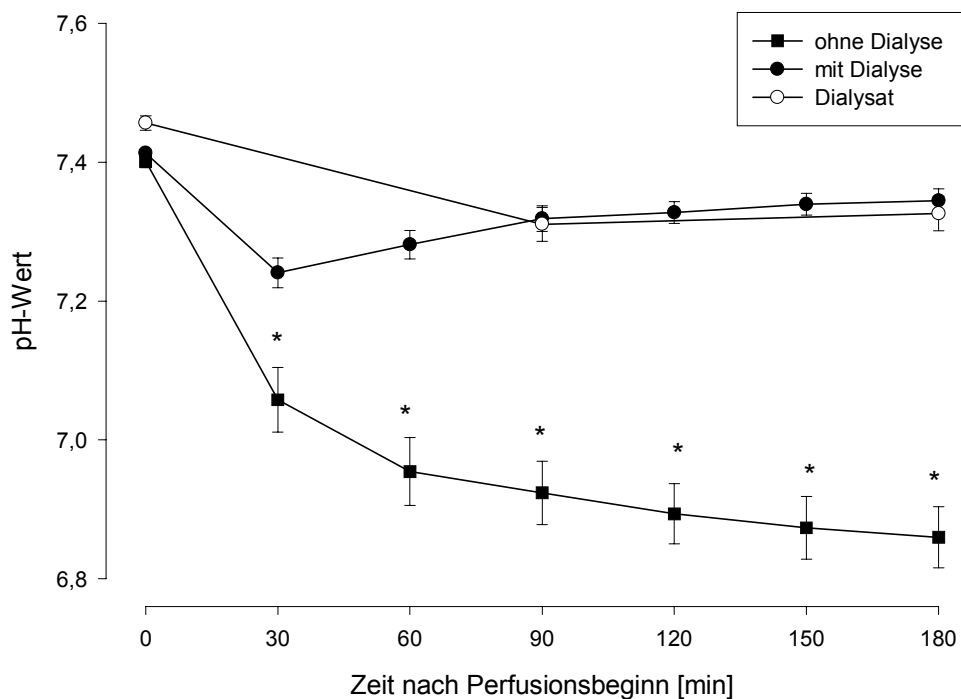


Abbildung 15: Der pH-Wert der Gruppe 1 fiel kontinuierlich mit dem Perfusionsbeginn während in Gruppe 2 nur in den ersten 30 Minuten ein pH Abfall gemessen wurde. Eine statistische Signifikanz von $p < 0,05$ wurde für den Meßzeitpunkt 30 min und von $p < 0,0001$ für die Meßzeitpunkte 60, 90, 120, 150 und 180 min nach Perfusionsbeginn berechnet.

3.1.3 Die Enzymaktivitäten im Vergleich

Bei allen Versuchen der Gruppe 2 wurde am Ende der Perfusion die Aktivität der Transaminasen im Dialysat. Bei keiner Messung konnten Transaminasen nachgewiesen werden. Dies war zu erwarten, da auf Grund des Molekulargewichts der GOT, GPT und LDH von $M=93.000$, 110.000 bzw. 134.000 ein Übertritt durch die Dialysator-membran nicht möglich ist.

GOT (AST)

In Gruppe 1 stieg die Aktivität der GOT von dem Ausgangswert $9,0 \pm 2,4$ U/l pro 100g Lebergewicht in den ersten 30 min der Perfusion auf 81 ± 12 U/l pro 100g Lebergewicht. Im weiteren Verlauf nahm die GOT-Aktivität kontinuierlich weiter zu bis auf 120 ± 17 U/l pro 100g Lebergewicht nach 180 min. In Gruppe 2 stieg die GOT von $2,0 \pm 0,3$ U/l pro 100g Lebergewicht auf 50 ± 8 U/l pro 100g Lebergewicht nach 30 min und 82 ± 12 U/l pro 100g Lebergewicht nach 180 min. Der Aktivitätsunterschied der GOT im direkten Vergleich beider Gruppen war für die Meßpunkte 30, 60 und 90 min statistisch signifikant ($p < 0,05$). Der größte Unterschied fand sich für den 30 min Wert. Die Zunahme der GOT-Aktivität nach 30 min verlief weitgehend parallel (Abbildung 16).

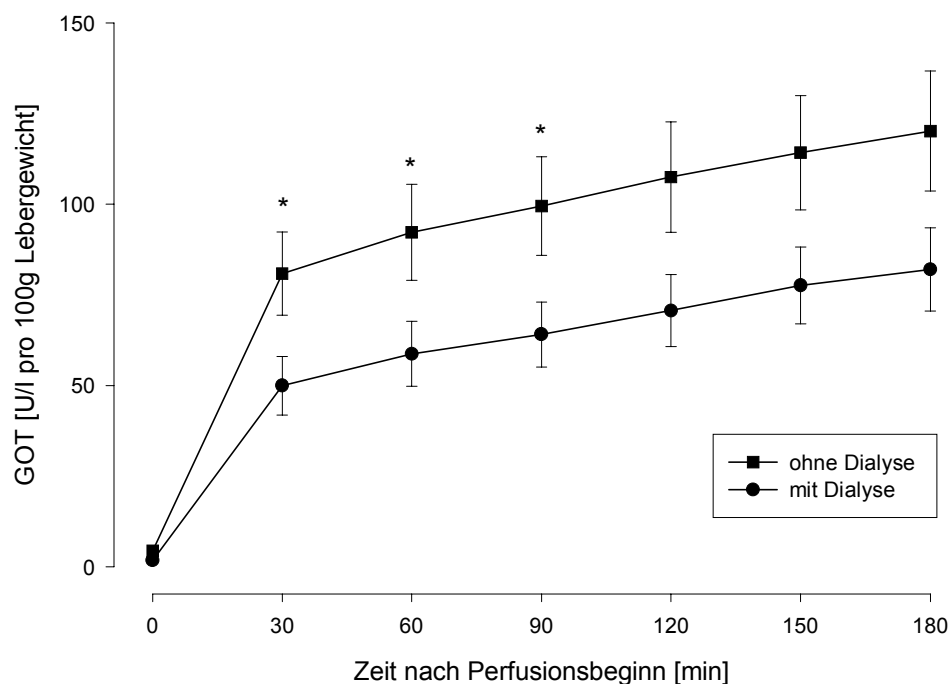


Abbildung 16: Die höchste Zunahme der GOT-Aktivität fand sich in den ersten 3 min nach Reperfusion. Die weitere Zunahme der GOT-Aktivität beider Gruppen verlief weitgehend parallel. Eine statistische Signifikanz von $p < 0,05$ wurde für die Meßpunkte 30, 60 und 90 min berechnet.

GPT (ALT)

Die GPT stieg in den ersten 30 min der Reperfusion in Gruppe 1 von $2,0 \pm 0,3$ U/l pro 100g Lebergewicht auf $5,8 \pm 0,8$ U/l pro 100g Lebergewicht und weiter auf $7,6 \pm 1,2$ U/l pro 100g Lebergewicht nach 180 min. In Gruppe 2 erhöhten sich die Werte von $0,9 \pm 0,2$ U/l pro 100g Lebergewicht auf $4,3 \pm 0,7$ U/l pro 100g Lebergewicht nach 30 min und auf $5,5 \pm 0,8$ U/l pro 100g Lebergewicht nach 180 min. Zu keinem Zeitpunkt waren die Unterschiede der GPT-Aktivitäten beider Gruppen statistisch signifikant.

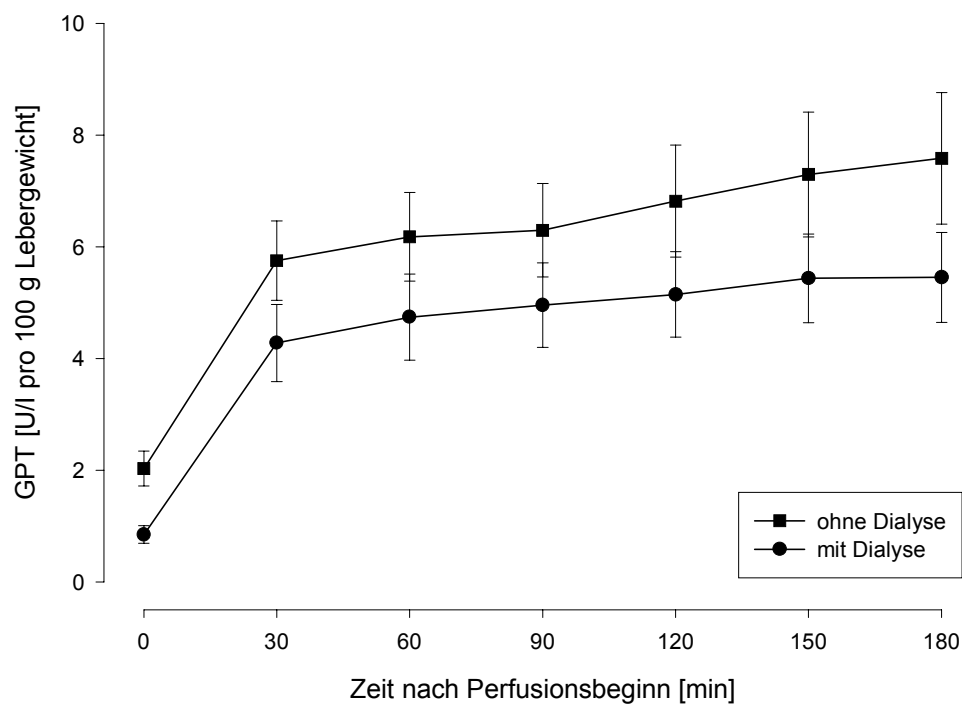


Abbildung 17: Zunahme der GPT-Aktivität beider Gruppen während der dreistündigen Perfusion. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen wurde zu keinem Zeitpunkt berechnet

LDH

Innerhalb der ersten 30 min der Reperfusion stieg die LDH in Gruppe 1 von 20 ± 2 U/l auf 80 ± 8 U/l pro 100g Lebergewicht, in Gruppe 2 von 19 ± 2 U/l auf 63 ± 6 U/l pro 100g Lebergewicht. Im weiteren Verlauf erhöhten sich die Werte nach 180 min in Gruppe 1 auf 115 ± 9 U/l und in Gruppe 2 auf 88 ± 7 U/l pro 100g Lebergewicht. Damit lag die LDH-Aktivität in Gruppe 1 signifikant höher als in Gruppe 2 ($p < 0,05$) nach 180 min.

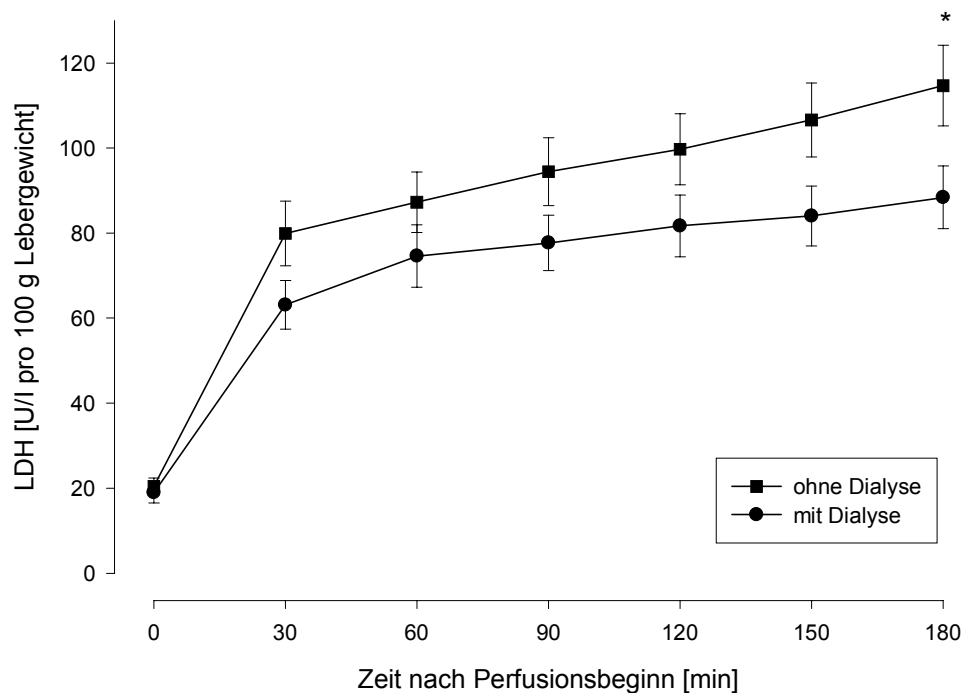


Abbildung 18: Zunahme der GPT-Aktivität beider Gruppen während der dreistündigen Perfusion. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen wurde zu keinem Zeitpunkt berechnet

3.1.4 Sauerstoffverbrauch, Galle- und Harnstoffproduktion

Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch in Gruppe 1 betrug nach 30 min $12,3 \pm 1,2$ ml/min pro 100g Lebergewicht, in Gruppe 2 zum selben Meßpunkt $11,8 \pm 1,3$ ml/min pro 100g Lebergewicht. Im weiteren Verlauf der Perfusion sank der Sauerstoffverbrauch in beiden Gruppen ab und erreichte in Gruppe 1 nach 180 min Werte von $2,3 \pm 0,5$ ml/min pro 100g Lebergewicht. In Gruppe 2 wurden nach 180 min $3,6 \pm 0,5$ ml/min Sauerstoff pro 100g Lebergewicht verbraucht. Zu diesem Zeitpunkt überschritt der Unterschied im Sauerstoffverbrauch beider Gruppen das Signifikanzniveau ($p=0,0437$).

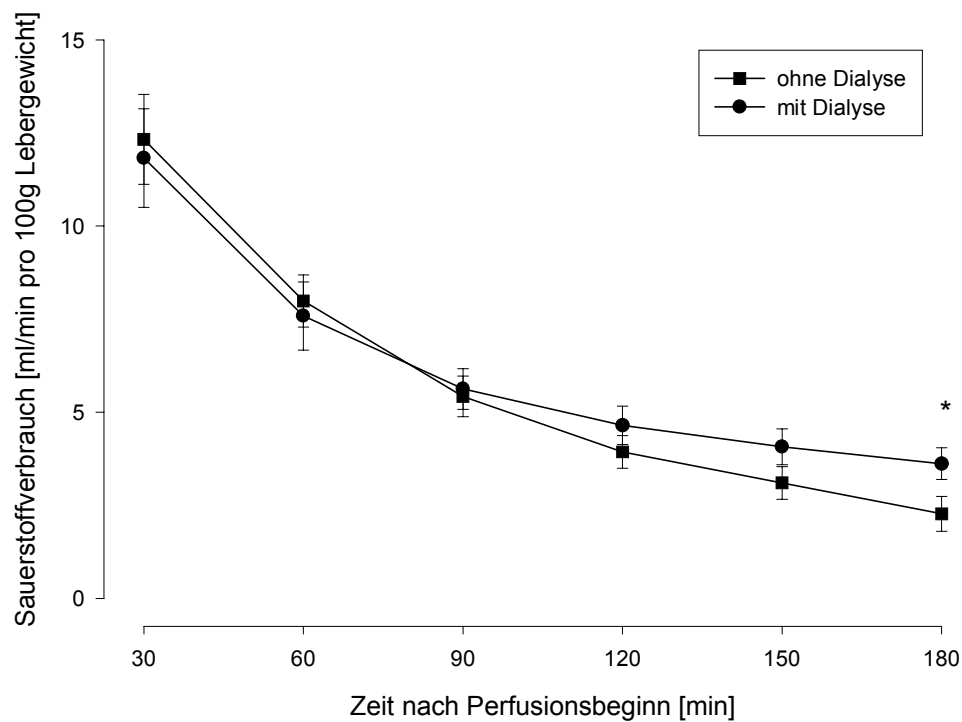


Abbildung 19: Sauerstoffverbrauch in beiden Gruppen während der dreistündigen Perfusion mit statistisch signifikantem Unterschied nach 3 h Perfusion.

Galleproduktion

Die Galleproduktion setzte in beiden Gruppen ca. 20 min nach Reperfusion ein und dauerte über den gesamten Perfusionszeitraum an. In Gruppe 1 wurden pro 100g Lebergewicht $1,1 \pm 0,1$ ml Galle während der dreistündigen Perfusion gebildet. Dem gegenüber steht eine signifikant ($p=0,016$) höhere Galleproduktion in Gruppe 2 mit $1,9 \pm 0,3$ ml/3h pro 100g Lebergewicht (Abbildung 20).

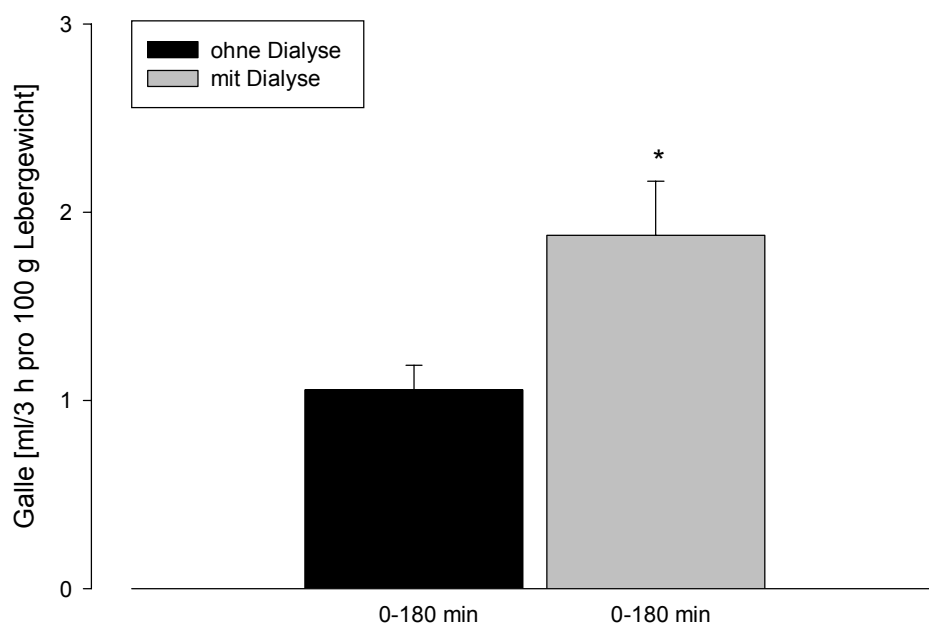


Abbildung 20: Die Gallegesamtproduktion nach 3 h Perfusion lag in Gruppe 2 signifikant über der Galleproduktion in Gruppe 1.

Harnstoffproduktion

Die Harnstoffkonzentration stieg in Gruppe 1 in den ersten 30 min der Perfusion von $1,4 \pm 0,3$ mg/dl auf $2,6 \pm 0,4$ mg/dl pro 100g Lebergewicht. Nach 180 min Perfusion betrug die Harnstoffkonzentration $3,4 \pm 0,5$ mg/dl pro 100g Lebergewicht. Nach 30 Minuten nahm die Harnstoffkonzentration im Perfusat der Gruppe 1 praktisch kontinuierlich zu. In Gruppe 2 veränderten sich die Ausgangswerte von $1,1 \pm 0,2$ mg/dl pro 100g Lebergewicht während der gesamten Perfusion nur unwesentlich. Nach 180 min betrug die Harnstoffkonzentration im Perfusat $1,2 \pm 0,1$ mg/dl.

Zur Äquilibration wurde ca. 10 Minuten vor Reperfusion der Leber mit der Dialyse des Perfusats begonnen. Zum Zeitpunkt 0 betrug deshalb die Harnstoffkonzentration im Dialysat $0,07 \pm 0,03$ mg/dl. Im weiteren Verlauf stieg die Harnstoffkonzentration nach 90 min auf $0,9 \pm 0,1$ mg/dl pro 100 g Lebergewicht und $1,1 \pm 0,1$ mg/dl pro 100 g Lebergewicht nach 180 min an, was einer signifikanten Zunahme entsprach ($p < 0,0001$). Im direkten Vergleich ist die Perfusatkonzentration für Harnstoff in Gruppe 1 zu allen Zeitpunkten während der Perfusion signifikant höher als in Gruppe 2 (Abbildung 21).

Die Berechnung der Harnstoffproduktion in Gruppe 1 beruht auf der Konzentrationszunahme im Perfusat. Während die Harnstoffkonzentration im Perfusat der Gruppe 2 weitgehend konstant blieb, stieg sie im Dialysat signifikant an und wurde für die Berechnung der Harnstoffbilanz addiert.

In Gruppe 1 wurden innerhalb der ersten 90 min $7,4 \pm 1,3$ mg Harnstoff pro 100g Lebergewicht synthetisiert verglichen mit $8,0 \pm 1,0$ mg/100g Lebergewicht in Gruppe 2. In den folgenden 90 min wurden in Gruppe 1 weitere $1,5 \pm 0,4$ mg Harnstoff pro 100g Lebergewicht, in Gruppe 2 weitere $2,9 \pm 0,7$ mg/100g produziert (Abbildung 22). In der Gesamtbilanz lag der Harnstoff in Gruppe 1 bei $8,9 \pm 1,3$ mg/100g Lebergewicht, und in Gruppe 2 bei $10,9 \pm 1,4$ mg/100g Lebergewicht. Zu allen Zeitpunkten produzierten die Lebern in Gruppe 2 mehr Harnstoff als in Gruppe 1. Jedoch wurde das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht erreicht.

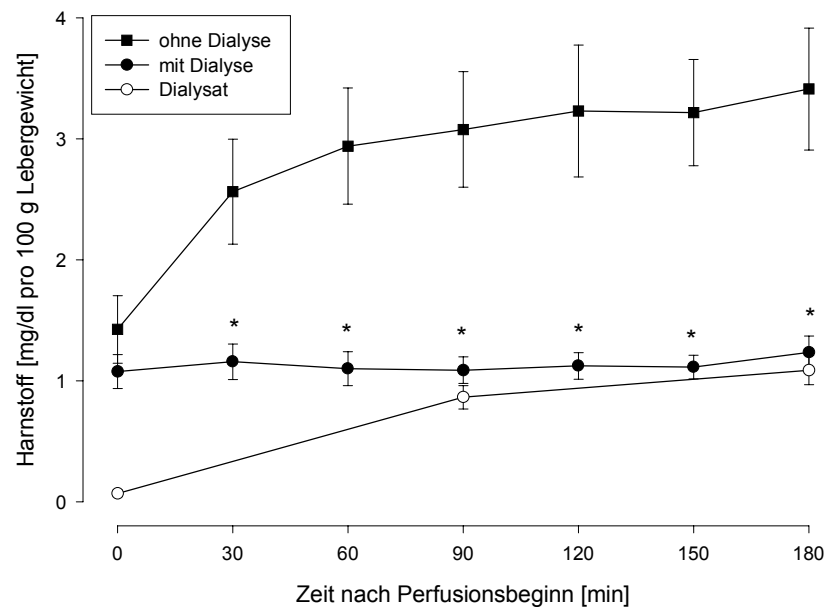


Abbildung 21: Die Harnstoffkonzentration beider Gruppen während der dreistündigen Perfusion zeigt zu allen Meßpunkten einen statistisch signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 2.

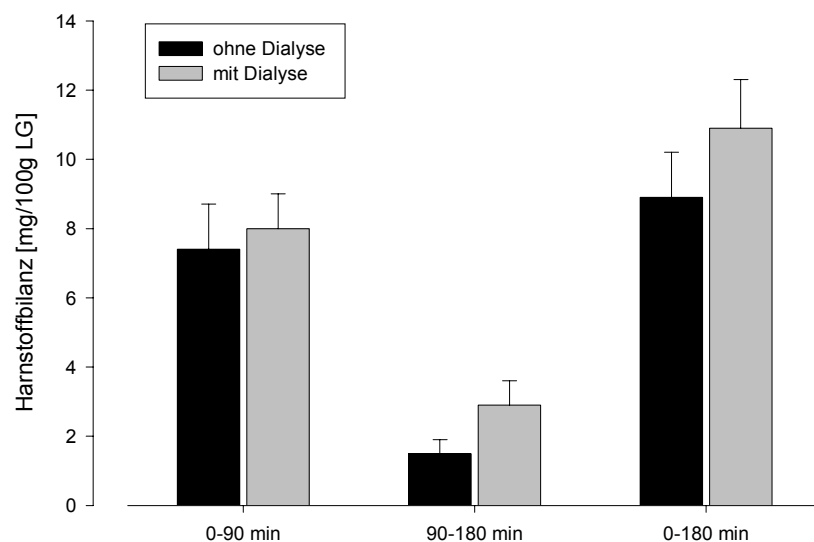


Abbildung 22: Die Harnstoffproduktion während der Perfusion war in Gruppe 2 zu allen Zeitpunkten höher als in Gruppe 1, erreicht aber keine statistische Signifikanz.

3.2 Lebertransplantation nach vorausgegangener NELP

3.2.1 Chirurgisches Modell

Die Arterialisierung des Transplantats über die Anastomose des Truncus coeliacus des Spenders mit der Bifurkation A. duodenalis / A. hepatica communis des Empfängers erwies sich als geeignet, um eine zuverlässige Leberdurchblutung zu ermöglichen. Nur in einem Fall wurde post mortem eine Thrombose der A. hepatica communis nach Transplantation in Gruppe 6 beobachtet. Dieser Versuch wurde aus der Wertung genommen und wiederholt, da es sich um eine chirurgisch technische Ursache handelte.

Die Verwendung eines veno-venösen Bypasses der zur anhepatischen Phase in die V. jugularis interna, V. cava inf. und V. portae gelegt wurde, führte in keinem Fall zu Komplikationen. Zwar ist dessen Anlage nicht zwingend erforderlich, erleichtert jedoch das anästhesiologische Management erheblich, da die hämodynamischen Druckschwankungen während der Transplantation weniger hoch ausfallen⁸². Dies war insbesondere bei den von uns genutzten Masttieren, die über eine nur geringe cardiopulmonale Reserve verfügten, da sie auf maximalen Fleischzuwachs hin gezüchtet wurden, besonders wichtig⁸³.

Die Anastomosierung der suprahepatischen und infrahepatischen V. cava inf. sowie der V. portae waren problemlos. In keinem Fall kam es zu Blutungen oder Thrombosen. Der Ductus choledochus ist beim Schwein vergleichsweise großlumig. Entsprechend unkompliziert war dessen Anastomose. In fünf Fällen wurde die Anastomose über einem Röhrchen durch Ligaturen durchgeführt. In 2 Fällen führte diese zu einer Stenosierung durch Slutge mit anschließender Cholestase ab dem fünften Tag. Da die sonstige Leberfunktion unauffällig war, wurden die Ergebnisse beider Versuche in den Gruppen 2 und 6 ausgewertet.

3.2.2 Primäre Organ-Nicht-Funktion nach Lebertransplantation

In den Gruppen 1, 2 und 3 kam es direkt nach Transplantation zu einer guten primären Leberfunktion. Nach 103 Minuten warmer Ischämie in Gruppe 4 nahmen sofort 5 von 6 transplantierte Lebern die Funktion auf. In einem Fall kam es nach Transplantation zu einer primären Nichtfunktion. In Gruppe 5 nahm keine der transplantierten Lebern ihre Funktion auf. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Transplantation verstarben alle Schweine. Bereits die Reperfusion unterschied sich von der in den anderen Gruppen, bis auf jene, die in Gruppe 4 zum Leberausfall führte, dadurch, daß sie sehr inhomogen war. Es zeigten sich zahlreiche hypoperfundierten Areale.

Der Leberausfall war gekennzeichnet durch eine diffuse Blutungsneigung, eine nicht einsetzende Spontanatmung und das Erlöschen der Corneal- und Schmerzreflexe.

Im Endstadium waren eine Beatmung mit 100 % O₂ und hoch dosierte Noradrenalin-gaben zur Aufrechterhaltung des systemischen Blutdruckes erforderlich.

In jedem Schwein, daß nach 60 Minuten warmer Ischämie und 4 Stunden normothermer extrakorporaler Leberperfusion transplantiert wurde (Gruppe 6), nahm die Leber sofort ihre Funktion auf.

3.2.3 Überleben

Ein Schwein in Gruppe 1 entwickelte ab dem 5. Tag nach Transplantation Fieber, eine Cholestase und zeigte ansteigende Transaminasen, trotz Immunsuppression und Antibiose. Aus diesem Grund erfolgte entsprechend den tierschutzrechtlichen Auflagen die Tötung am 7. Tag. Als Ursache fand sich histologisch eine schwere Abstoßung. Einen pathologischen Hinweis auf eine generalisierte Infektion gab es nicht. Die Anastomosen waren unauffällig.

In Gruppe 3 verstarb am 4. Tag ein Schwein an einer eitrigen Pneumonie und in Gruppe 4 am 6. Tag. Trotz einer Ulkus Prophylaxe mit Omeprazol kam es bei einem Schwein aus Gruppe 3 am 7. Tag zu einer letalen gastrointestinalen Blutung bei guter Leberfunktion. Ursache waren ein 4cm messendes Magengeschwür sowie begleitend eine erosive Gastritis. Der gesamte Magen-Darmtrakt war mit Blut gefüllt. Ein Schwein in Gruppe 6 dislozierte den arteriellen Katheter am 3. postoperativen Tag und verblutete in Folge. Die gesamte klinische Situation insbesondere die Leberfunktion waren unauffällig.

3.2.4 Biochemische Parameter nach Lebertransplantation

Die postoperativen Zeitpunkte beziehen sich auf die portalvenöse Reperfusion. Die Werte nach portalvenöser Reperfusion wurden mit den jeweiligen präoperativen Laborparameter verglichen.

α-GST

In allen 6 Versuchsgruppen stieg die Konzentration der α-GST nach Reperfusion an. In Gruppe 1 und 2 wurden mit 54±10 bzw. 58±18 µg/l bereits nach 15 min die höchsten Konzentrationen gemessen. 12h nach Reperfusion waren die Werte wieder auf das Ausgangsniveau gesunken. In Gruppe 3 wurde der Maximalwert 6h nach Reperfusion und der Ausgangswert nach 24h erreicht. Zu keinem Zeitpunkt gab es zwischen den Gruppen 1 bis 3 signifikante Unterschiede in den Konzentrationen der α-GST.

In den Gruppen 4 bis 6 war der Konzentrationsanstieg nach Reperfusion signifikant höher. In Gruppe 4 stieg die α -GST bis auf $513 \pm 148 \mu\text{g/l}$ 3h nach Reperfusion und erreichte nach 24h Ausgangswerte. In Gruppe 5 setzte sich der Konzentrationsanstieg bis 12h nach Reperfusion fort und betrug maximal $597 \pm 79 \mu\text{g/l}$. Die α -GST der Gruppe 6 erreichte 15 min nach Reperfusion mit $154 \pm 42 \mu\text{g/l}$ ihren Höchstwert. Nach 1h und nach 6h war die α -GST-Konzentration der Gruppe 6 signifikant niedriger als in den Gruppen 5 und 6.

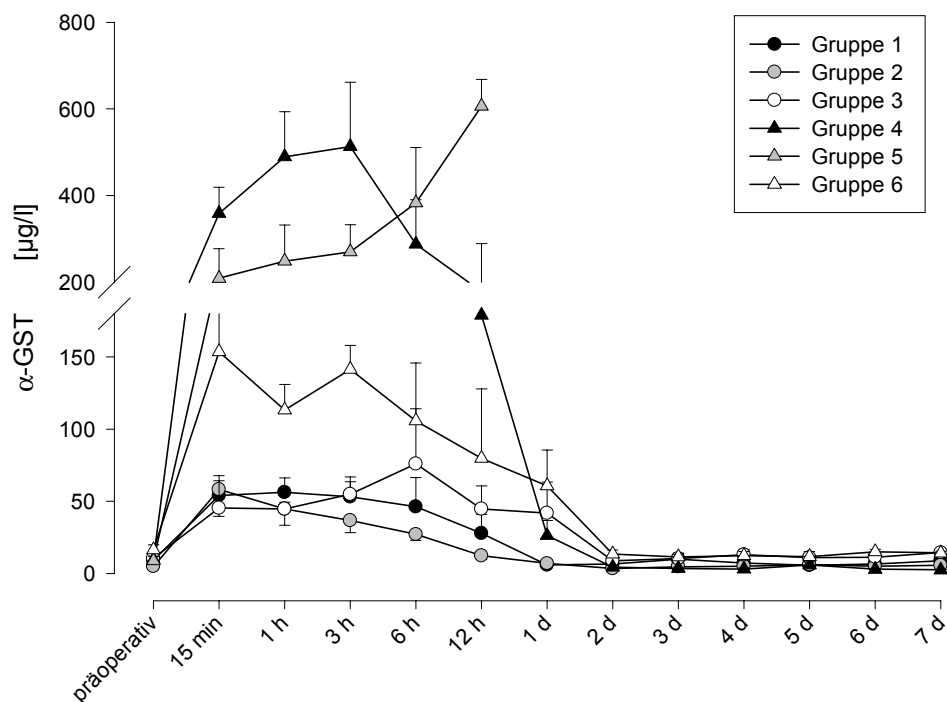


Abbildung 23: Prä- und postoperative Serumkonzentrationen der α -GST.

GOT

Die GOT-Aktivität betrug präoperativ 26 ± 1 U/l. Wie auch die α -GST stieg die Aktivität der GOT in allen Gruppen 15 min nach Reperfusion an. Die Aktivitätszunahme war in den Gruppen 4 – 6 stärker als in den Gruppen 1 - 3.

Der Maximalwert in Gruppe 1 betrug 409 ± 132 U/l 6h nach Reperfusion. In Gruppe 2 betrug das Maximum 373 ± 84 U/l 12h nach Reperfusion. In den Gruppen 1 und 2 wurden die Ausgangswerte bereits am 3. postoperativen Tag erreicht. Der Aktivitätsanstieg in den Gruppen 3 und 4 erreichte am 1. postoperativen Tag einen Maximalwert von 734 ± 366 bzw. 1627 ± 506 U/l. In Gruppe 3 lag die GOT-Aktivität erst am 6. postoperativen Tag wieder im Bereich der Ausgangswerte, in Gruppe 4 am 4. Tag. In Gruppe 5 erreichte die GOT-Aktivität 12h nach Reperfusion 1570 ± 171 U/l. Der Aktivitätszunahme in Gruppe 6 setzte sich bis zum 1. postoperativen Tag fort und erreichte einen Wert von 603 ± 141 U/l. Am 7. postoperativen Tag blieb die GOT mit 165 ± 48 U/l erhöht.

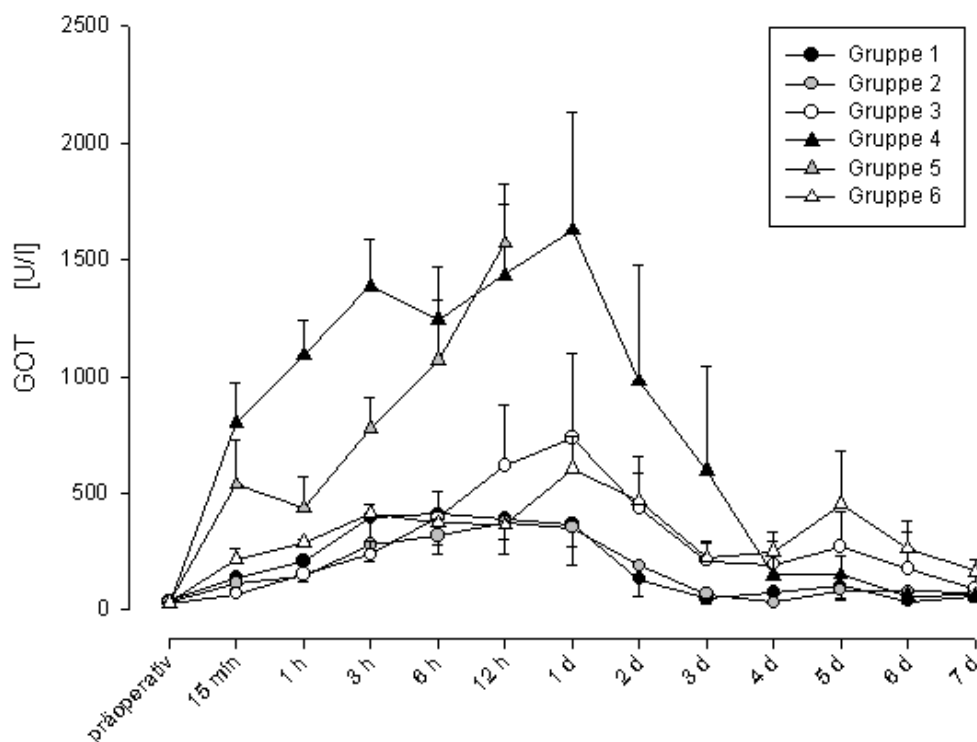


Abbildung 24: Prä- und postoperative Serumkonzentrationen der GOT.

GPT

Im Unterschied zu α -GST und GOT stieg die GPT 15 min nach Reperfusion nur in den Gruppen 4 und 5 an. Der Maximalwert in Gruppe 4 war nach 3h erreicht, und fiel dann kontinuierlich bis zum 7. Tag. Die Zunahme der GPT Aktivität in Gruppe 5 erreichte nach 12h einen Maximalwert von 61 ± 16 U/l (Abbildung 25). Sowohl in den Gruppen 1,2 und 3 als auch in der Gruppe 6 wurden die höchsten Aktivitäten der GPT 24 h nach LTX gemessen. In diesen Gruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zu den Ausgangswerten.

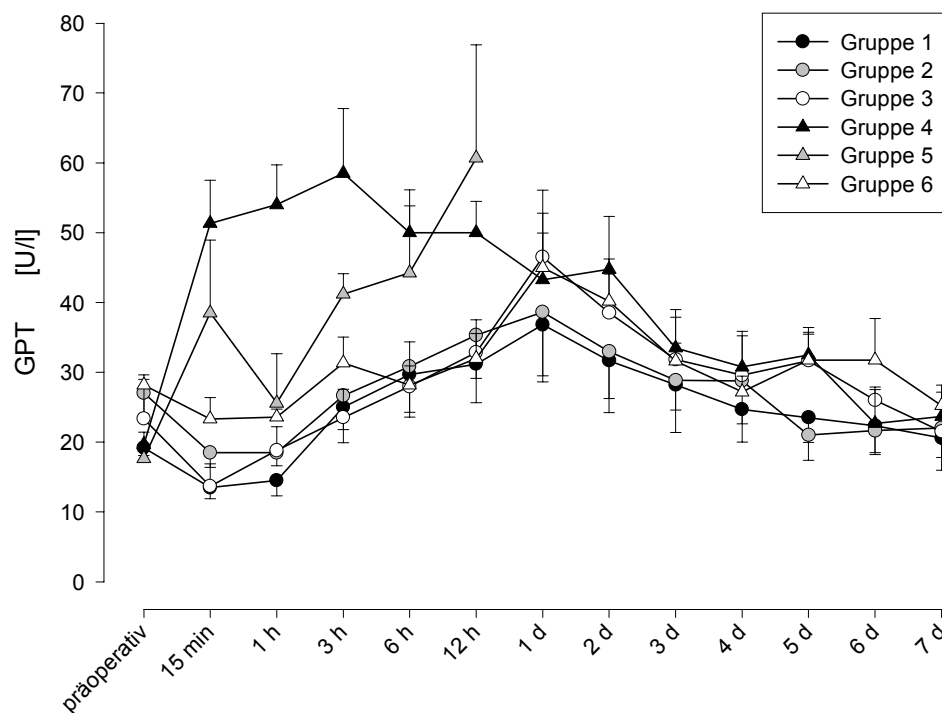


Abbildung 25: Prä- und postoperative Serumkonzentrationen der GPT.

LDH

Die LDH-Aktivität von Schweinen liegt mit einem Mittel von ca. 545 U/l (S. 18) wesentlich über jenem Wert der humanen Bestimmungen. Präoperativ wurde in der Vergleichsgruppe ein Wert von 610 ± 18 U/l gemessen. In allen Gruppen begann der Aktivitätsanstieg innerhalb der ersten 3h nach Reperfusion. Der Maximalwert wurde mit Ausnahme von Gruppe 5 24h nach LTX gemessen. Er betrug für die Gruppen 1, 2, 3 und 6 2867 ± 1404 , 2105 ± 848 , 3845 ± 1030 bzw. 2239 ± 507 U/l. Am 3. postoperativen Tag lag die LDH-Aktivität wieder im Bereich des Ausgangswertes. Zu keinem gegebenen Zeitpunkt gab es zwischen den Gruppen 1, 2, 3 und 6 signifikante Unterschiede in der LDH-Aktivität.

Die LDH der Gruppe 4 stieg 15 min nach Reperfusion auf 2470 ± 493 U/l und erreichte nach 24h ein Maximum von 6383 ± 1546 U/l. Mit 1750 ± 197 U/l bleibt LDH bis zum 7. postoperativen Tag erhöht. In Gruppe 5 stieg die LDH-Aktivität bis zu 12h nach Reperfusion auf 4520 ± 299 U/l an.

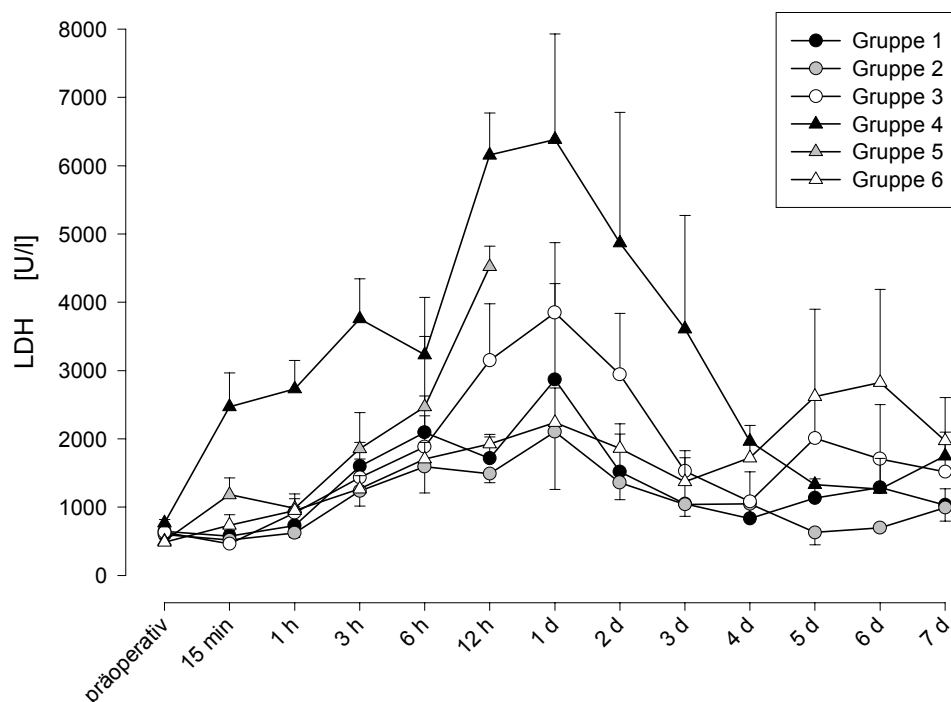


Abbildung 26: Prä- und postoperative Serumkonzentrationen der LDH.

γGT und Bilirubin

Die Aktivitäten der γGT lagen für alle Gruppen nach Transplantation zwischen 10 und 45 U/l. Zu keinem Zeitpunkt unterschieden sich die γGT Aktivitäten weder innerhalb der Gruppen vor oder nach Reperfusion, noch zwischen den Gruppen signifikant.

Auch für das Bilirubin traten postoperativ keine signifikanten Schwankungen innerhalb oder zwischen den Gruppen auf. Die medianen Konzentrationen innerhalb der Gruppen differierten zwischen 0,25 und 1,4 mg/dl bis zum 4. postoperativen Tag. Als Folge einer Abstoßungsreaktion (Gruppe 1), sowie zweier Ductus choledochus Stenosierungen (Gruppe 2 und 6) kam es in diesen Gruppen zu einem Anstieg der Bilirubinkonzentration auf 2,5 mg/dl am siebten postoperativen Tag, ohne daß der Unterschied zu den anderen Gruppen statistisch signifikant wurde.

Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäurekonzentration in Gruppe 1 nahm am Ende der anhepatischen Phase auf 1406 ± 279 µg/l zu, erreichte 60 min nach Reperfusion ein Maximum von 1548 ± 278 µg/l und fiel 12h nach Reperfusion auf 419 ± 55 µg/l ab. Bereits nach 3h war der anhepatische Wert unterschritten. In Gruppe 2 stieg die Hyaluronsäure am Ende der anhepatischen Phase auf 1668 ± 112 µg/l und erreichte 3h nach Reperfusion ein Maximum von 2371 ± 392 µg/l. Erst 12h nach Reperfusion wurde der Wert der anhepatischen Phase unterschritten.

Am Ende der anhepatischen Phase betrug die Hyaluronsäurekonzentration in Gruppe 3 1172 ± 181 µg/l, erreichte 60 min nach Reperfusion den Maximalwert von 1552 ± 266 µg/l, unterschritt den anhepatischen Wert nach 6h und war 12h nach Reperfusion auf 754 ± 232 µg/l abgefallen. Die Hyaluronsäurekonzentration der Gruppe 4 stieg am Ende der anhepatischen Phase auf 1700 ± 227 µg/l an und erreichte 3h nach Reperfusion den Maximalwert von 1864 ± 214 µg/l. Die anhepatische Hyaluronsäurekonzentration war in Gruppe 4 bereits nach 6h deutlich unterschritten. Die höchsten Hyaluronsäurekonzentrationen wurden nach 3, 6 und 12 Stunden in Gruppe 5 gemessen. Der Höchstwert von 2737 ± 899 µg/l wurde nach 6 Stunden erreicht. Am Ende der anhepatischen Phase in Gruppe 6 betrug die Hyaluronsäurekonzentration 1177 ± 94 µg/l. Bereits der erste Meßwert 1h nach Reperfusion lag niedriger als der anhepatische Wert. Die Hyaluronsäurekonzentration in Gruppe 6 fiel 12h nach Reperfusion auf 418 ± 120 µg/l ab.

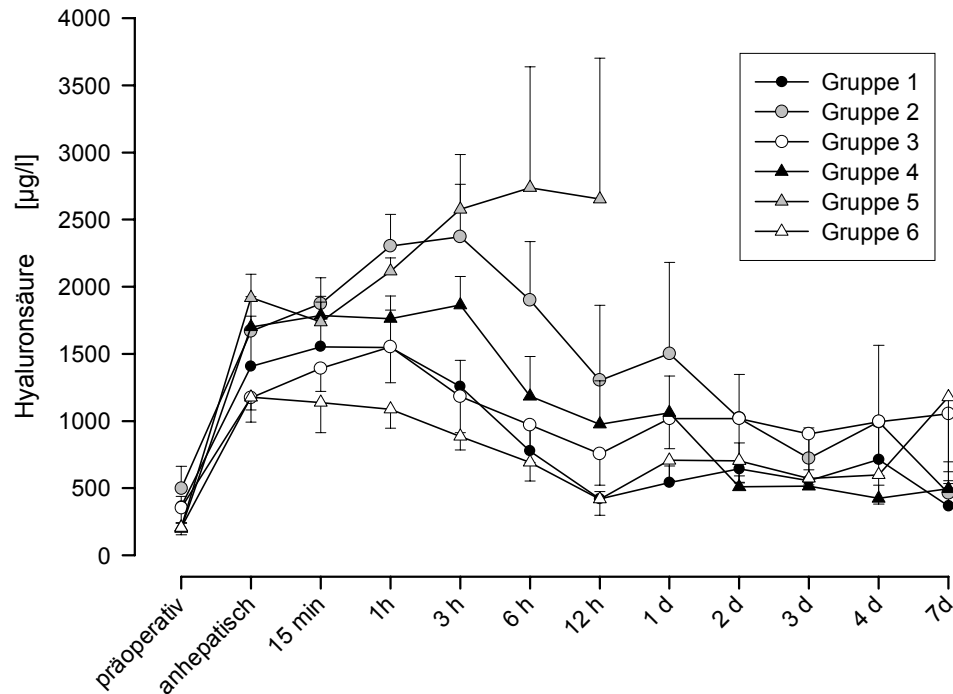


Abbildung 27: Die Hyaluronsäurekonzentration steigt während der anhepatischen Phase an. Nach Reperfusion sinken die Hyaluronsäurespiegel innerhalb der ersten 6h unter die anhepatischen Werte für die Gruppe 1, 3, 4 und 6 ab. Wurde die Leber kalter Ischämie ausgesetzt (Gruppen 2 und 6) lagen die Hyaluronsäurekonzentrationen bis zum ersten postoperativen Tag über denen der anderen Gruppen. Die Gruppe 2 zeigte einen vergleichsweise verzögerten Abbau der Hyaluronsäure in den Stunden nach Reperfusion.

Gesamtprotein und Albumin

Die Gesamtproteinverläufe der Versuchsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant. Präoperativ lag das Gesamtprotein zwischen $4,5 \pm 0,1$ g/dl in Gruppe 1 und $5,6 \pm 0,3$ g/dl in Gruppe 4. 15 min nach Reperfusion fielen die Proteinkonzentrationen auf Werte zwischen $2,2 \pm 0,2$ g/dl in Gruppe 1 und $2,6 \pm 0,3$ g/dl in Gruppe 5 als Folge der Volumensubstitution ab. Anschließend stiegen die Konzentrationen bis zum 7. Tag. In den anderen Gruppen erreichten die Proteinkonzentrationen am 7. Tag nahezu den Ausgangsbereich: Gruppe 1 $3,9 \pm 0,3$ g/dl, Gruppe 2 $5,0 \pm 0,3$ g/dl, Gruppe 3 $4,3 \pm 0,2$ g/dl, Gruppe 4 $5,1 \pm 0,3$ g/dl und in Gruppe 6 $4,5 \pm 0,4$ g/dl.

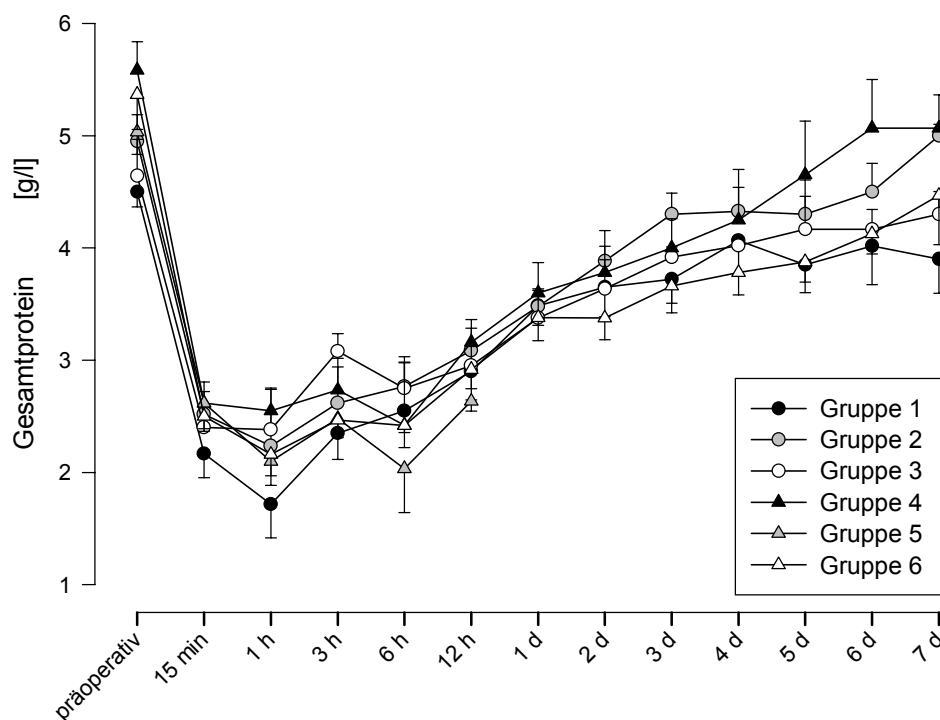


Abbildung 28: Prä- und postoperative Serumkonzentrationen der Proteine.

Der Konzentrationsverlauf des Albumins entsprach weitgehend dem des Gesamtproteins. Präoperativ lagen die Werte zwischen 2,3 bis 2,9 g/dl, fielen nach Reperfusion um ca. die Hälfte ab und bewegten sich ab dem 2. postoperativen Tag nahe der Ausgangswerte, mit steigender Tendenz. Auch für das Albumin gab es zwischen den Gruppen zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede.

Thromboplastinzeit (TPZ, Quick)

Die präoperativen Werte der TPZ lagen zwischen 85 und 115%. Während der frühen postoperativen Phase nahm die TPZ in allen Gruppen ab. Von dem ersten Tag nach LTX stieg sie deutlich an und lag bei allen Gruppen zu diesem Zeitpunkt bei über 65%. Signifikante Unterschiede ließen sich zwischen den Gruppen nicht berechnen.

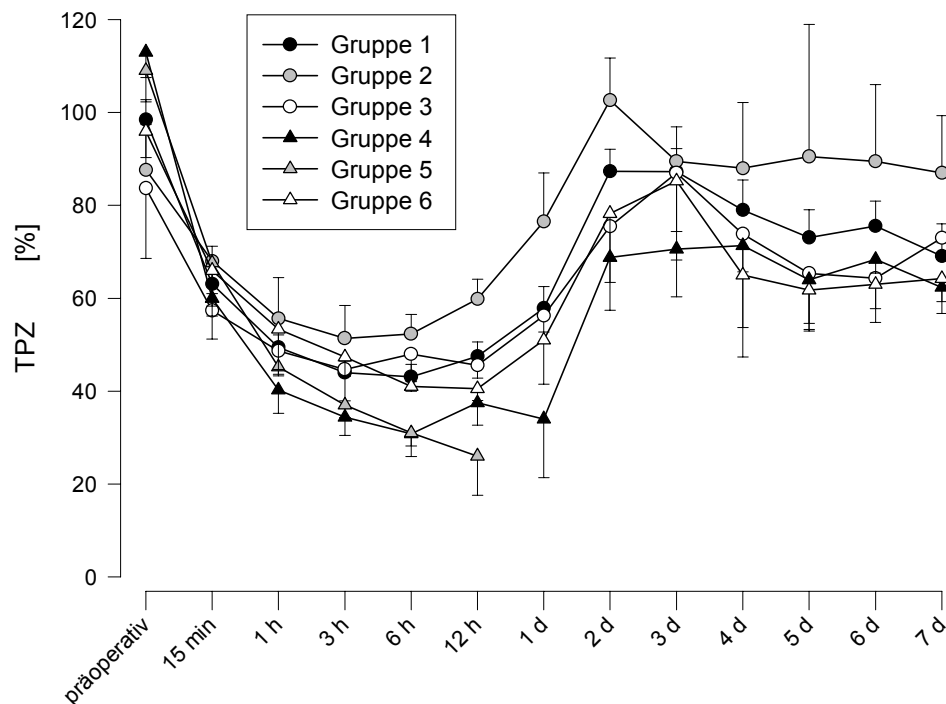


Abbildung 29: Prä- und postoperative Serumkonzentrationen der TPZ nach Reperfusion

Harnstoff

Der Verlauf des Harnstoffs war in allen Gruppen ähnlich und lag präoperativ in allen Gruppen zwischen 16 ± 1 mg/dl und 19 ± 2 mg/dl. Nach Reperfusion stieg die Harnstoffkonzentration bis zum 1. Tag und fluktuiert zwischen 25 und 50 mg/dl ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

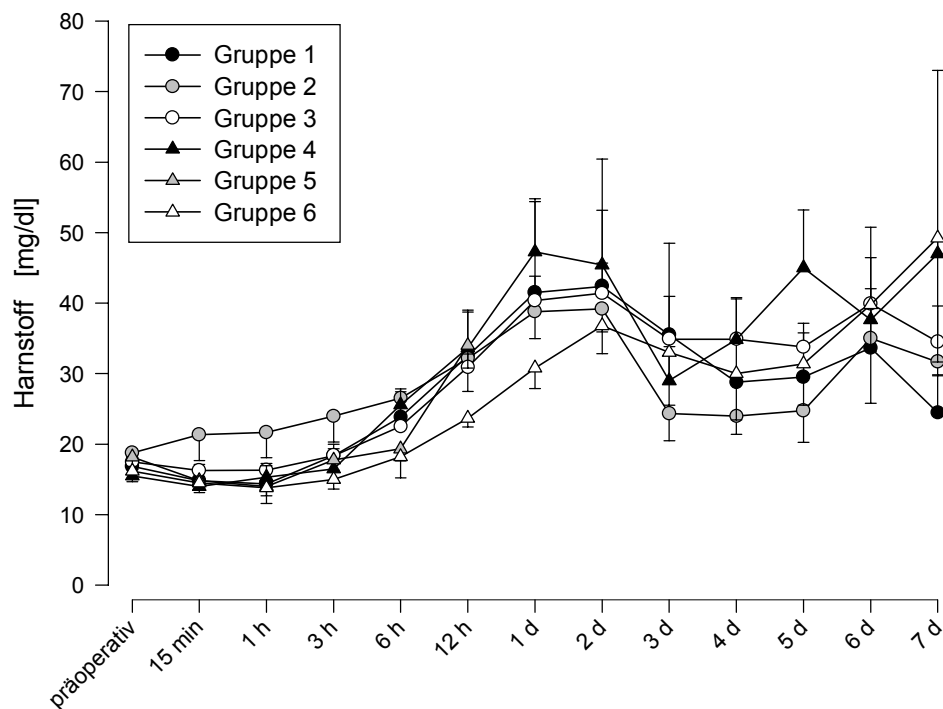


Abbildung 30: Prä- und postoperative Serumkonzentrationen von Harnstoff

Kreatinin

Das Kreatinin lag präoperativ zwischen $1,2 \pm 0,1$ mg/dl und $1,7 \pm 0,1$ mg/dl. Es war zu keinem Zeitpunkt nach Transplantation erhöht und blieb bis zum 7. Tag in allen Gruppen im Bereich der Ausgangswerte.

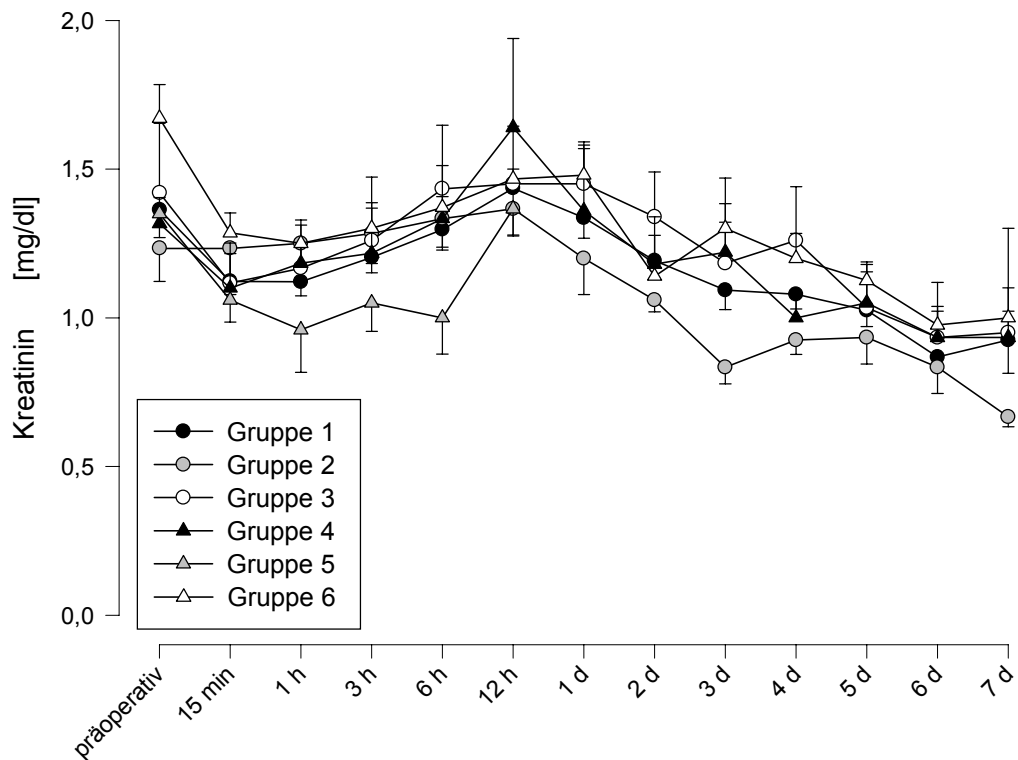


Abbildung 31: Prä- und postoperative Serumkonzentrationen von Kreatinin

3.2.5 Parameter während der vierstündigen NELP in Gruppe 3 und 6

Natrium

In beiden Gruppen lag die Natriumkonzentration zu allen Meßzeitpunkten innerhalb der physiologischen Werte von 132 und 144 mmol/l.

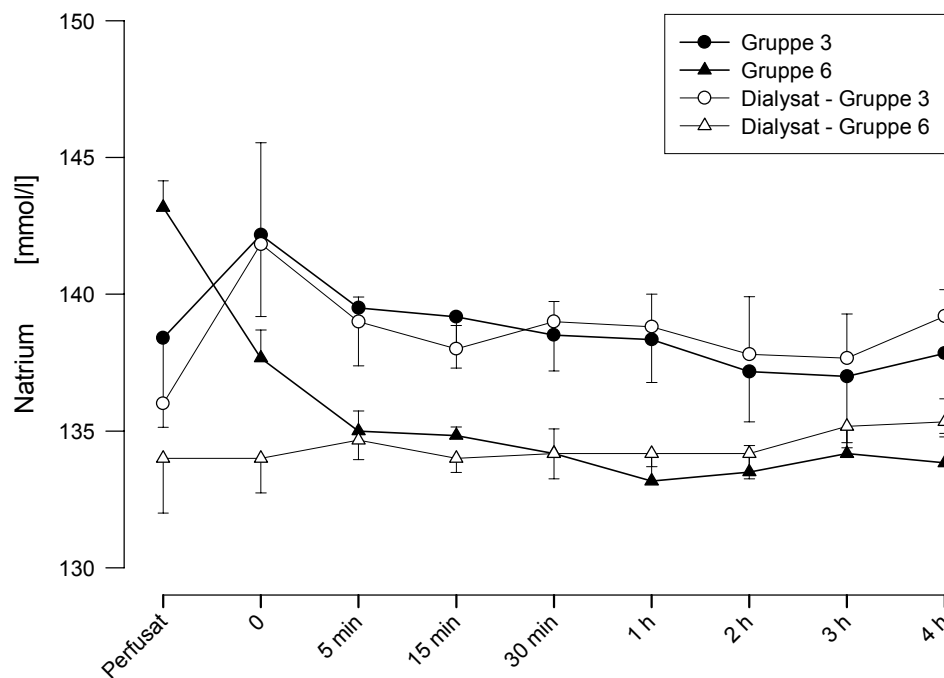


Abbildung 32: Natriumkonzentration in Perfusat und Dialysat der Gruppen 3 und 6 während der vier stündigen NELP.

Kalium

Vor der Reperfusion betrug die Kaliumkonzentration im Perfusat $4,8 \pm 0,9$ mmol/l in Gruppe 3 und $4,1 \pm 0,5$ mmol/l in Gruppe 6. Bis zum Ende der Perfusion fiel sie in beiden Gruppen ab auf $3,2 \pm 0,2$ mmol/l. Im Dialysat lag die Kaliumkonzentration in Gruppe 3 bei $2,1 \pm 0,1$ mmol/l und in Gruppe 6 bei $2,3 \pm 0,1$ mmol/l vor Reperfusion und nach 240 min bei $3,3 \pm 0,1$ mmol/l. Die Konzentration des Kaliums war während der Perfusion zwischen beiden Gruppen sehr ausgeglichen. Ebenso unterschieden sich die Konzentrationen zwischen dem Perfusat und Dialysat bereits nach 5 min nur noch marginal.

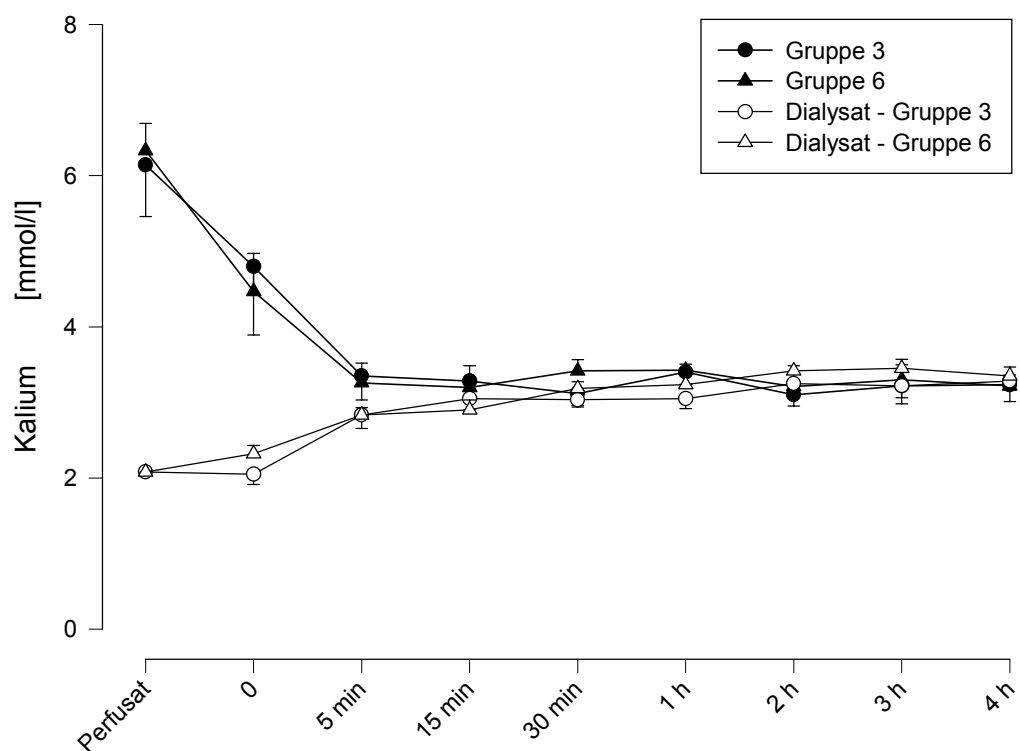


Abbildung 33: Kaliumkonzentration in Perfusat und Dialysat der Gruppen 3 und 6 während NELP

α -GST

In Gruppe 3 betrug die α -GST im Perfusat vor Reperfusion $2,2 \pm 1,0$ $\mu\text{g/l}$ pro 100g/LG und stieg 5 Minuten nach Reperfusion auf $5,2 \pm 2,1$ $\mu\text{g/l}$ pro 100g LG an. Bis zum Ende der Perfusion kam es zu keiner weiteren Zunahme der Aktivität. In Gruppe 6 betrug die α -GST-Konzentration vor der Reperfusion $2,4 \pm 0,42$ $\mu\text{g/l}$ pro 100g LG. Sie stieg 5 Minuten nach Reperfusion auf $22 \pm 4,96$ $\mu\text{g/l}$ an und erreichte nach 180 min ein Maximum von $51 \pm 8,7$ $\mu\text{g/l}$ pro 100g LG. Am Ende der Perfusion nach 240 Minuten lag der Wert bei $45 \pm 8,2$ $\mu\text{g/l}$ pro 100g LG. Die α -GST, wie auch die Transaminasen GOT, GPT und LDH konnten im Dialysat beider Gruppen nicht nachgewiesen werden (vergleiche Kapitel 3.1.3).

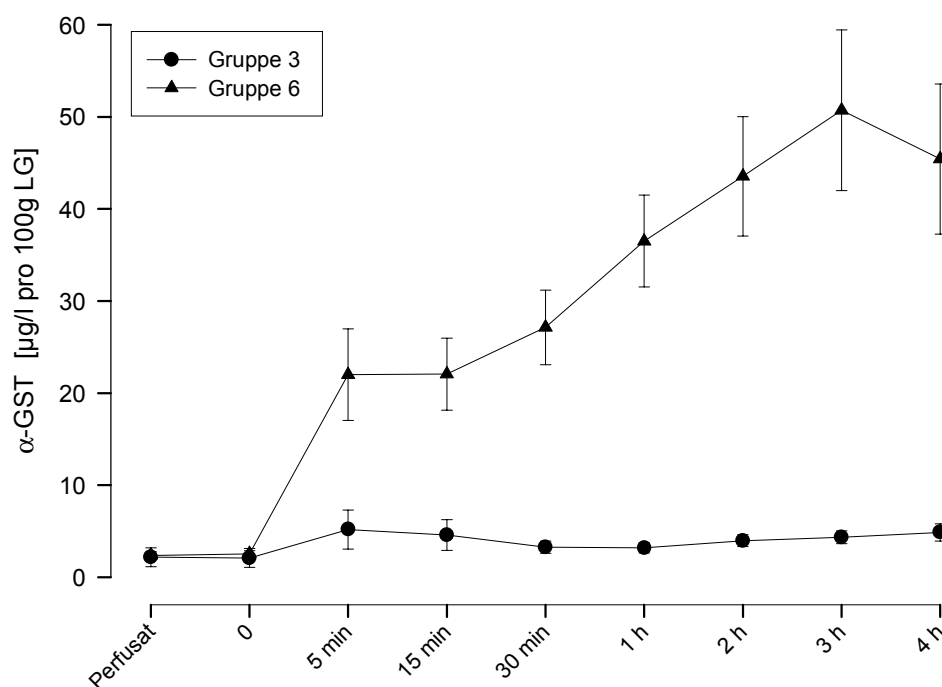


Abbildung 34: α -GST im Perfusat der Gruppen 3 und 6 während NELP

GOT

Vor Reperfusion betrug die GOT-Aktivität im Perfusat der Gruppen 3 und 6 $3,2 \pm 1,0$ bzw. $4,5 \pm 0,69$ U/l pro 100g LG. In Gruppe 3 stieg die GOT nach 60 min auf $8,73$ U/l pro 100g LG an. In Gruppe 6 war 5 min nach Reperfusion ein Anstieg auf $37 \pm 8,1$ U/l pro 100g LG zu verzeichnen. Ab der 30. Minute nach Reperfusion stieg GOT weiter an und erreichte 180 min nach Reperfusion ein Maximum von 78 ± 18 U/l pro 100g LG. Am Ende der Reperfusion nach 240 Minuten fiel es ab auf 75 ± 16 U/l pro 100g LG.

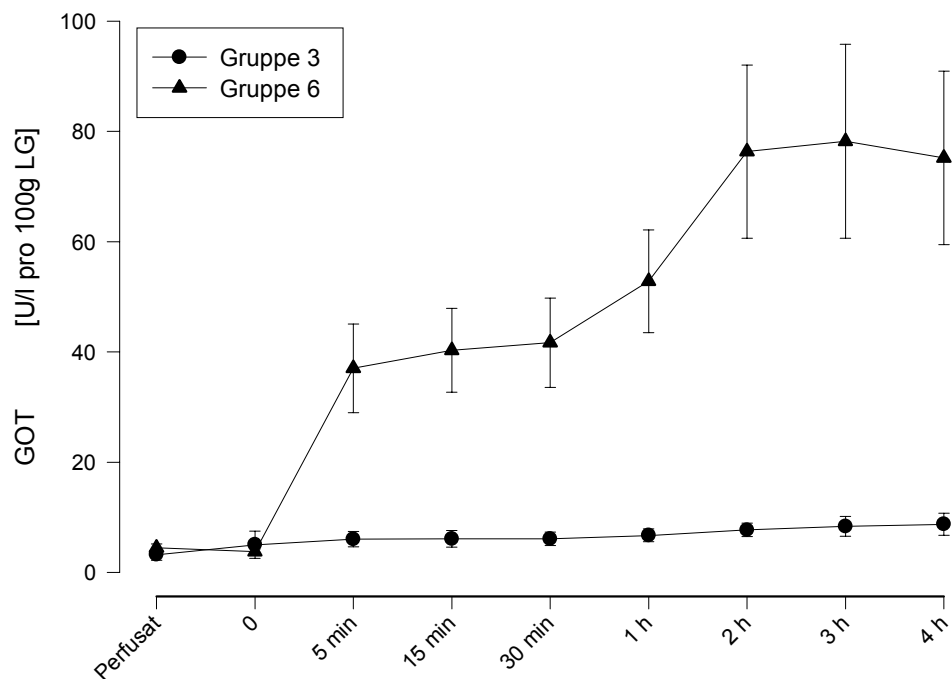


Abbildung 35: GOT im Perfusat der Gruppen 3 und 6 während NELP

GPT

In Gruppe 3 wurde während der vierstündigen Perfusion praktisch keine Aktivitätsänderung der GPT gemessen. In Gruppe 6 stieg die GPT nach 5 min Perfusion von $2,7 \pm 0,3$ auf $4,6 \pm 0,75$ U/l pro 100g LG an. Nach 120 Minuten wurde ein Maximum von $6,0 \pm 0,94$ U/l pro 100g LG erreicht. Am Ende der Perfusion fiel die Aktivität der GPT auf $5,3 \pm 0,67$ U/l pro 100g LG ab.

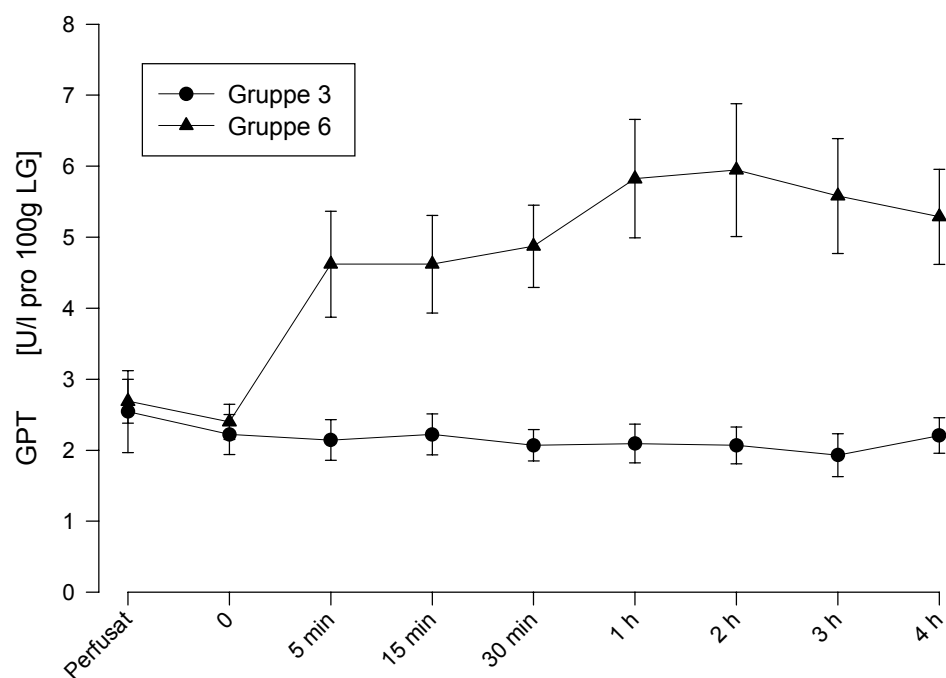


Abbildung 36: GPT im Perfusat der Gruppen 3 und 6 während NELP

LDH

In Gruppe 3 betrug die LDH-Aktivität vor Reperfusion 81 ± 25 U/l pro 100g LG und 5 Minuten nach Reperfusion 102 ± 33 U/l pro 100g LG. Nach 240 Minuten Perfusion war ein Wert von 143 ± 43 U/l pro 100g LG erreicht. In Gruppe 6 stieg die LDH 5 min nach Reperfusion auf 155 ± 17 und bis zur 120. Minute auf 253 ± 23 U/l pro 100g LG. Im weiteren Verlauf kam es zu keiner weiteren nennenswerten Aktivitätszunahme der LDH.

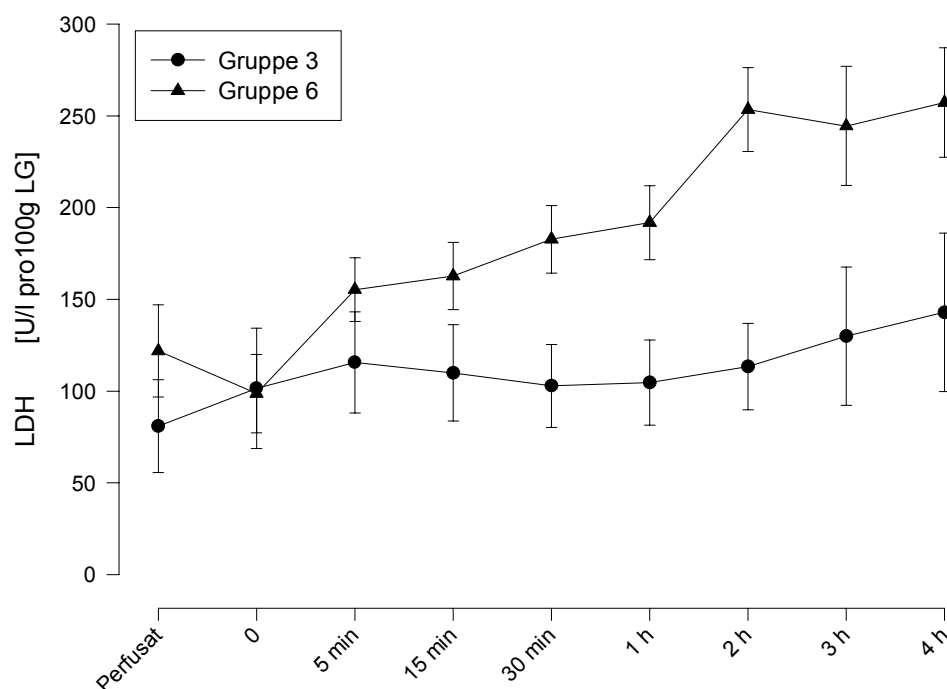


Abbildung 37: LDH im Perfusat der Gruppen 3 und 6 während NELP

Vergleich von α -GST, GOT, GPT und LDH untereinander

In Gruppe 3 zeigte die α -GST 5 min nach der Reperfusion einen 2,4-fachen Anstieg und blieb bis zum Ende der Perfusion nahezu unverändert hoch, während die GOT 5 min nach Reperfusion nach einer 1,2-fachen Zunahme weiter anstieg und am Ende der Perfusion das 1,7-fache erreichte. Die GPT wurde durch die Reperfusion nicht beeinflusst und lag während der gesamten Perfusion im Bereich des Ausgangswertes. Die LDH-Aktivität nahm 5 min nach der Reperfusion um das 1,1-fache zu und zeigte im Verlauf keinen weiteren wesentlichen Anstieg.

In Gruppe 6 zeigten α -GST, GOT, GPT und LDH während der Perfusion einen ähnlichen Verlauf. Alle Enzyme zeigten nach Reperfusion eine Zunahme der Aktivitäten. Die α -GST stieg 5 min nach Reperfusion auf das 9-fache, die GOT auf das 10-fache, die GPT auf das 2-fache und die LDH auf das 1,6-fache. Dem Konzentrations- und Aktivitätsverlauf aller Enzyme war gemeinsam, daß es ab der 2. Perfusionsstunde praktisch zu keiner weiteren Zunahme kam.

Galleproduktion

Die Bildung von Galle setzte in beiden Gruppen ca. 20 min nach Reperfusion ein und dauerte über den gesamten Perfusionszeitraum an. In Gruppe 3 wurden pro 100g Lebergewicht $4,3 \pm 0,5$ ml Galle während der vierstündigen Perfusion produziert. Dem gegenüber steht eine signifikant ($p=0,00081$) niedrigere Gallebildung in Gruppe 6 mit $1,8 \pm 0,2$ ml/4h pro 100g Lebergewicht (Abbildung 38).

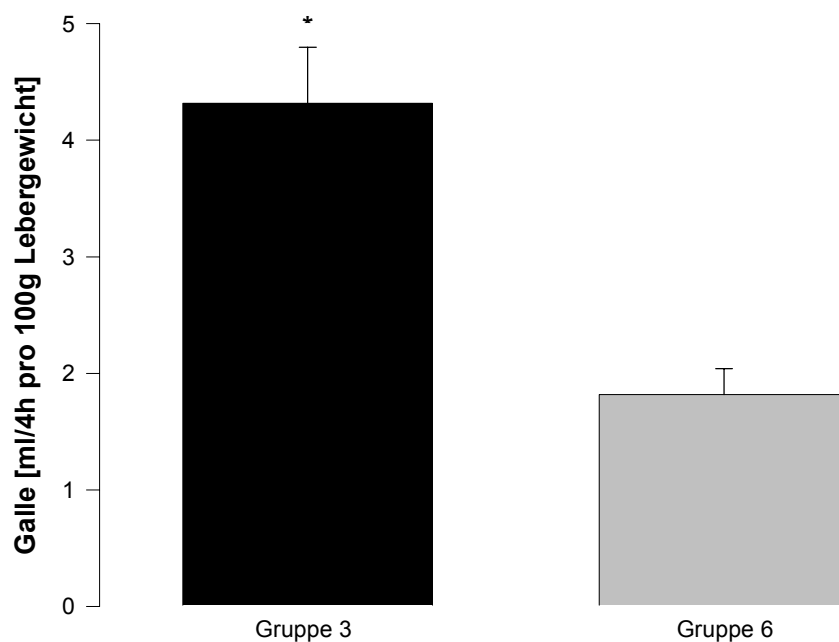


Abbildung 38: Die Gesamtproduktion der Galle in Gruppe 3 nach 4 Stunden NELP lag signifikant über der Gallegesamtproduktion in Gruppe 6 ($p<0,00081$).

Gesamtprotein und Albumin

der Gesamtproteingehalt des Perfusats änderte sich während der Perfusion nicht signifikant (Abbildung 39). Es fanden sich nur geringe Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Gleiches traf für die Albuminkonzentration im Perfusat zu, die vor Reperfusion bei 2,4 g/dl in der Gruppe 3 und 2,6 g/dl in Gruppe 6 lag. Nach vier Stunden Perfusion betrug die Albuminkonzentration in Gruppe 3 2,2 und in Gruppe 6 2,4 g/dl. Proteine ließen sich nicht im Dialysat nachweisen.

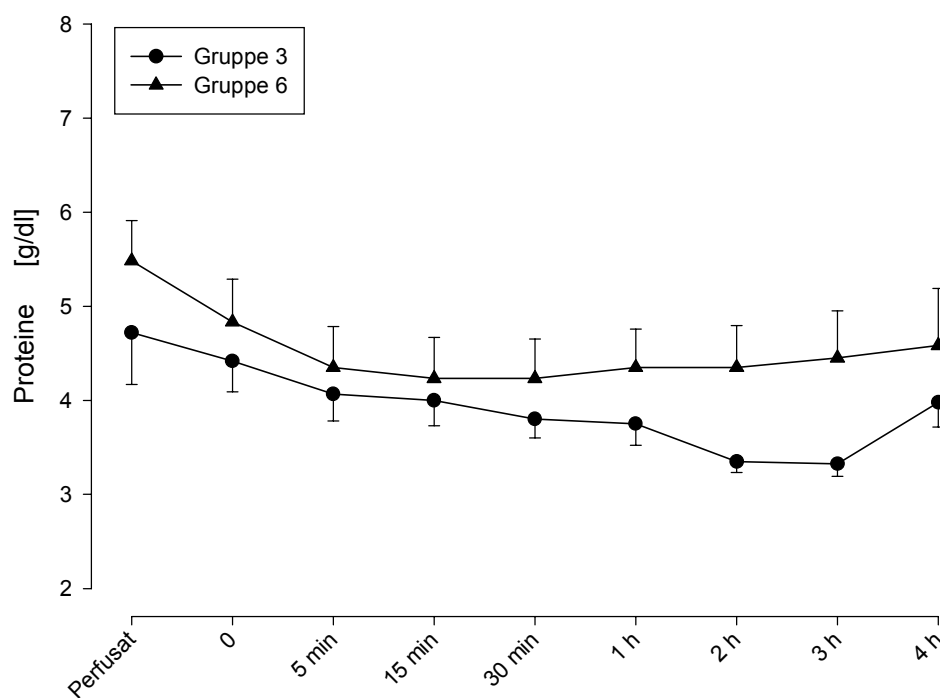


Abbildung 39: Proteine im Perfusat der Gruppen 3 und 6 während NELP

Hyaluronsäure

In Gruppe 3 wurde als Ausgangswert der Hyaluronsäure vor Reperfusion eine Konzentration von $113 \pm 29 \mu\text{g/l}$ gemessen. Sie nahm kontinuierlich zum Ende der Perfusion bis auf $48 \pm 27 \mu\text{g/l}$ ab. In Gruppe 6 betrug die Hyaluronsäure vor Reperfusion $93 \pm 7 \mu\text{g/l}$ und fiel 15 min nach Reperfusion auf $61 \pm 14 \mu\text{g/l}$ ab und erreichte 240 min nach Reperfusion einen Wert von $16 \pm 5 \mu\text{g/l}$. Die Konzentrationsunterschiede der Hyaluronsäure, wie auch die Abbauraten zwischen beiden Gruppen, waren statistisch nicht signifikant. Innerhalb der ersten halben Stunde hatte sich die anfängliche Hyaluronsäurekonzentration in den Gruppen 3 und 6 halbiert. Im Dialysat war Hyaluronsäure in beiden Gruppen nicht nachweisbar.

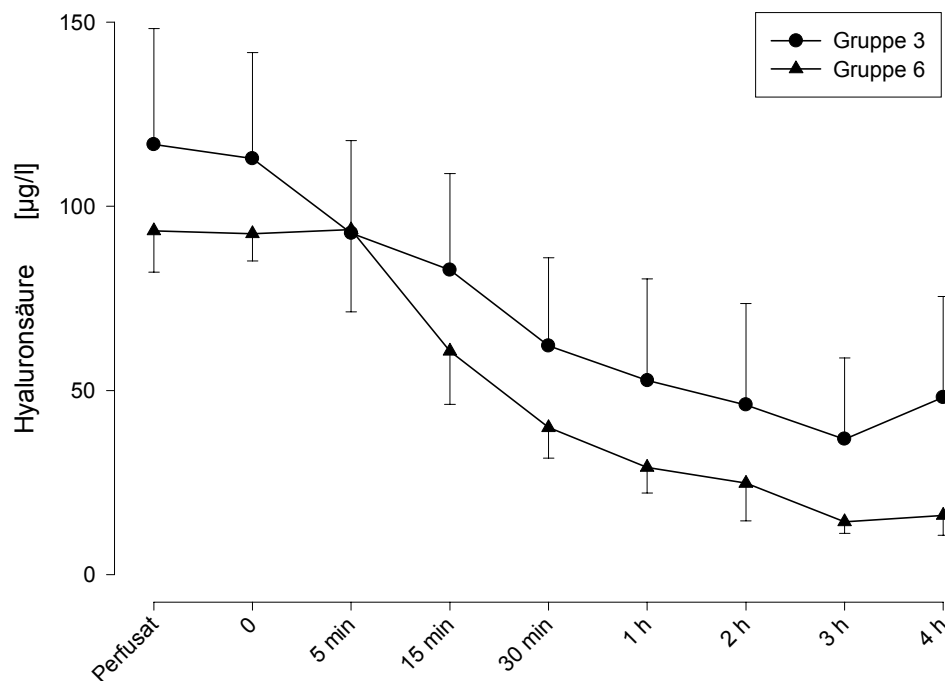


Abbildung 40: Hyaluronsäurekonzentration im Perfusat der Gruppen 3 und 6 während NELP

Harnstoff

Durch den Anschluß der Dialyse an den Perfusionskreislauf sank die Konzentration des Harnstoffs im gleichen Ausmaß innerhalb beider Gruppen. In Gruppe 3 lag die Harnstoffkonzentration im Perfusat vor Reperfusion bei 16 ± 5 mg/dl, sank innerhalb von 5 min nach Reperfusion auf 11 ± 1 mg/dl und blieb bis zum Ende der Perfusion konstant. Im Dialysat stieg die Harnstoffkonzentration von $0,8 \pm 0,6$ mg/dl vor Reperfusion bis auf $9,7 \pm 0,7$ mg/dl nach 240 min. In Gruppe 6 nahm die Harnstoffkonzentration im Perfusat von $13,0 \pm 0,6$ mg/dl auf 36 ± 2 mg/dl 240 min nach Reperfusion zu. Die Dialysatkonzentration erreichte nach 240 min einen Wert von $29 \pm 1,4$ mg/dl.

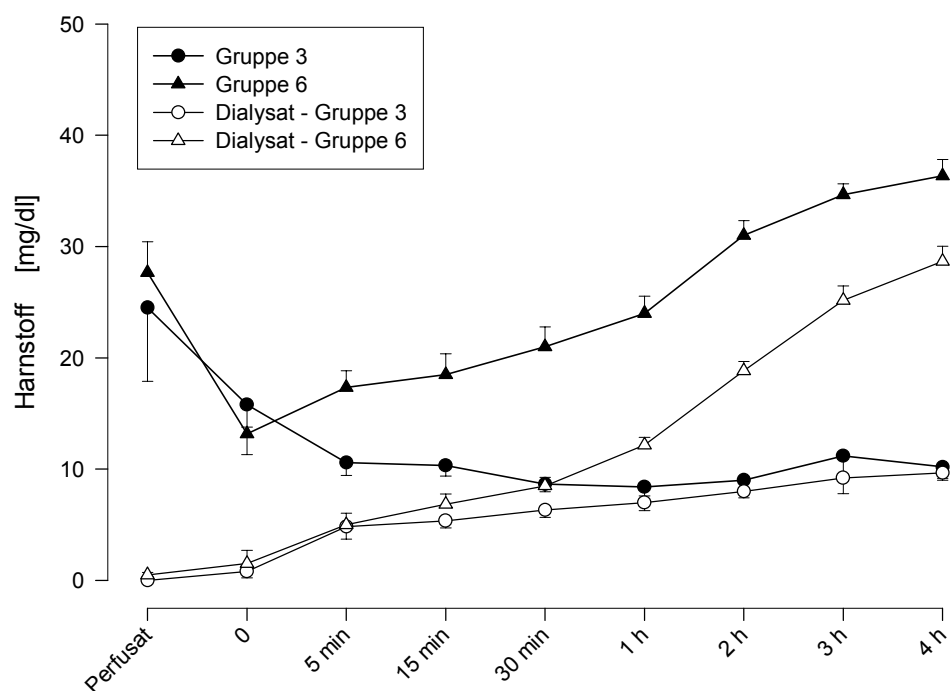


Abbildung 41: Harnstoff in Perfusat und Dialysat der Gruppen 3 und 6 während NELP

Ammoniak

Die Perfusatkonzentration von Ammoniak nahm in beiden Gruppen bereits durch den Anschluß an den Dialysekreislauf ab. Die Ausgangskonzentration an Ammoniak im Perfusat war trotz Gleichbehandlung des Bluts mit $259 \mu\text{mol/l}$ in Gruppe 6 höher als mit $162 \mu\text{mol/l}$ in Gruppe 3. Die Ursache hierfür ist unklar. Bei Reperfusion unterschieden sich die Ammoniakkonzentrationen beider Perfusate kaum. Nach 15 min blieb die Konzentration bis zum Ende der Perfusion in Gruppe 3 konstant bei $22 \pm 7 \mu\text{mol/l}$. Die Ammoniakkonzentration in Gruppe 6 betrug nach vier Stunden $37 \pm 6,0 \mu\text{mol/l}$. Im Dialysat der Gruppe 3 stieg der Wert von $17 \pm 6 \mu\text{mol/l}$ vor Reperfusion auf $42 \pm 8,5 \mu\text{mol/l}$ nach 5 min an. Am Ende der Perfusion nach 240 min lag die Ammoniakkonzentration bei $29 \pm 13 \mu\text{mol/l}$. In Gruppe 6 betrug die Konzentration des Ammoniaks im Dialysat vor Reperfusion $46 \pm 12 \mu\text{mol/l}$, stieg 5 min nach Reperfusion auf $89 \pm 12 \mu\text{mol/l}$ an und nahm im weiteren Verlauf nach 240 min auf $61 \pm 5,6 \text{ mg/dl}$ wieder ab.

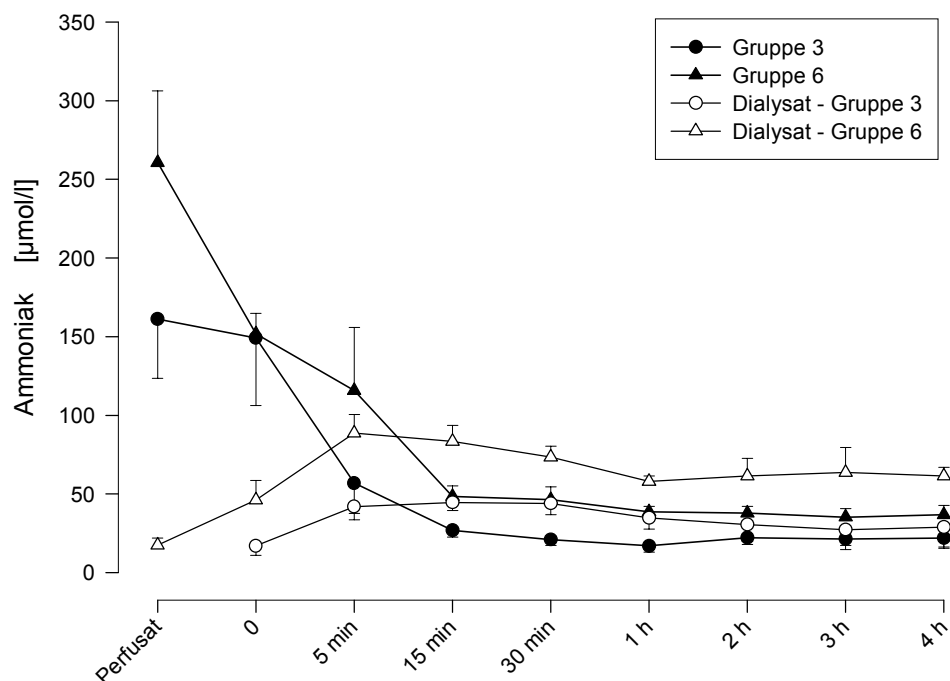


Abbildung 42: Ammoniak in Perfusat und Dialysat der Gruppen 3 und 6 während NELP

Leukozyten

Die Leukozytenkonzentration nahm in Gruppe 3 von $11 \pm 1 \text{ nl}^{-1}$ auf $3,0 \pm 0,4 \text{ nl}^{-1}$ und in Gruppe 6 von $12 \pm 1 \text{ nl}^{-1}$ auf $4,6 \pm 0,4 \text{ nl}^{-1}$ 5 min nach Reperfusion ab und blieb bis zum Ende der Perfusion unverändert.

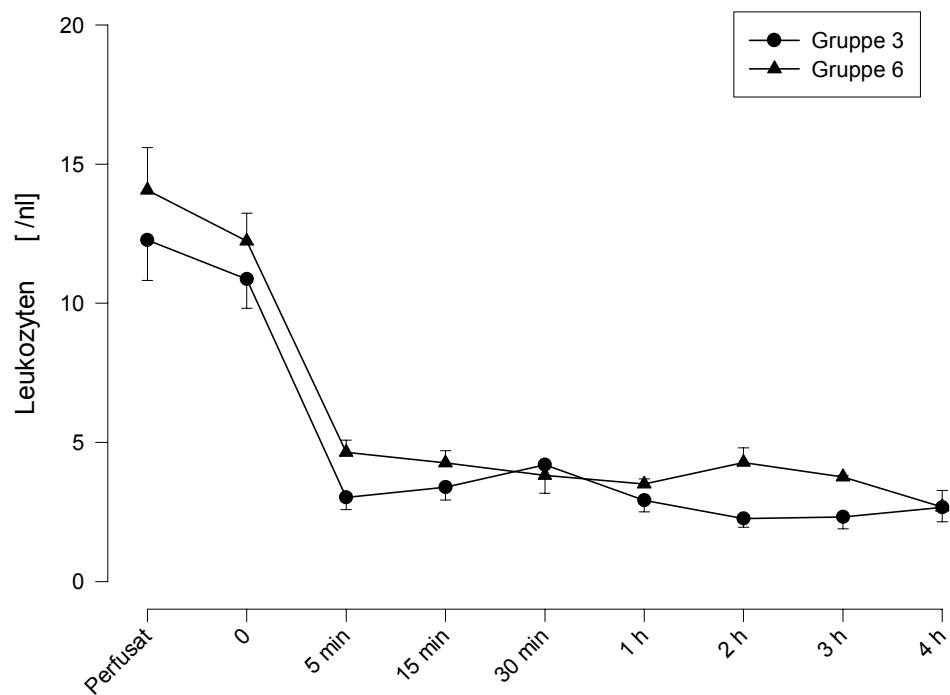


Abbildung 43: Leukozyten im Perfusat der Gruppen 3 und 6 während NELP

Thrombozyten

Die Thrombozytenzahl nahm während der vierstündigen Perfusion kontinuierlich leicht ab ohne statistische Signifikanz zu erreichen. In Gruppe 3 lag die Thrombozytenzahl zwischen $252 \pm 24 \text{ nl}^{-1}$ und $216 \pm 13 \text{ nl}^{-1}$ und in Gruppe 6 zwischen $209 \pm 38 \text{ nl}^{-1}$ und $152 \pm 35 \text{ nl}^{-1}$ (Abbildung 44).

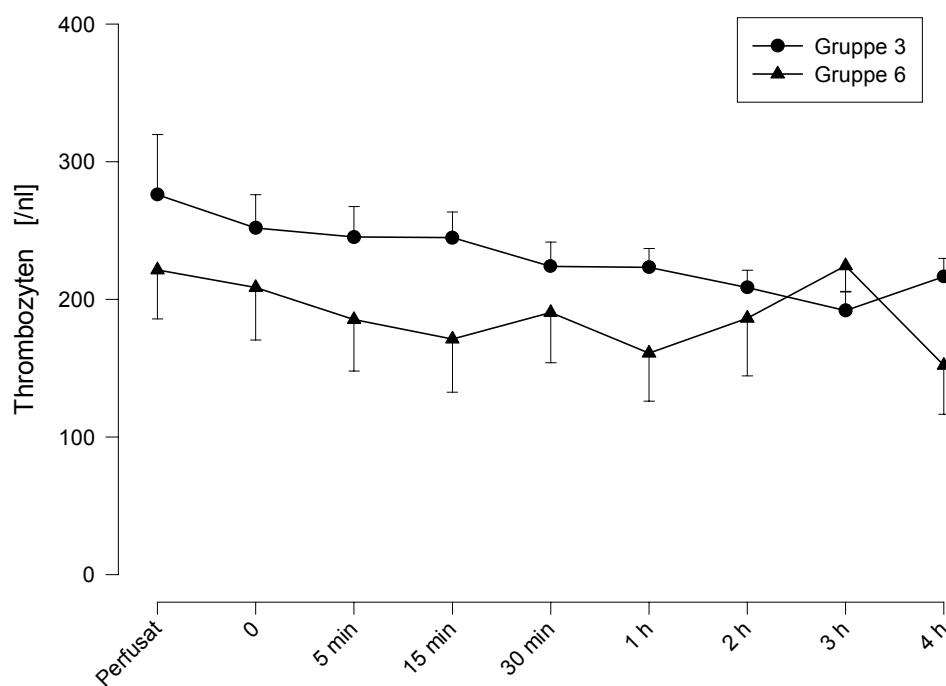


Abbildung 44: Thrombozyten im Perfusat der Gruppen 3 und 6 während NELP

3.2.6 Morphologische Ergebnisse nach licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen

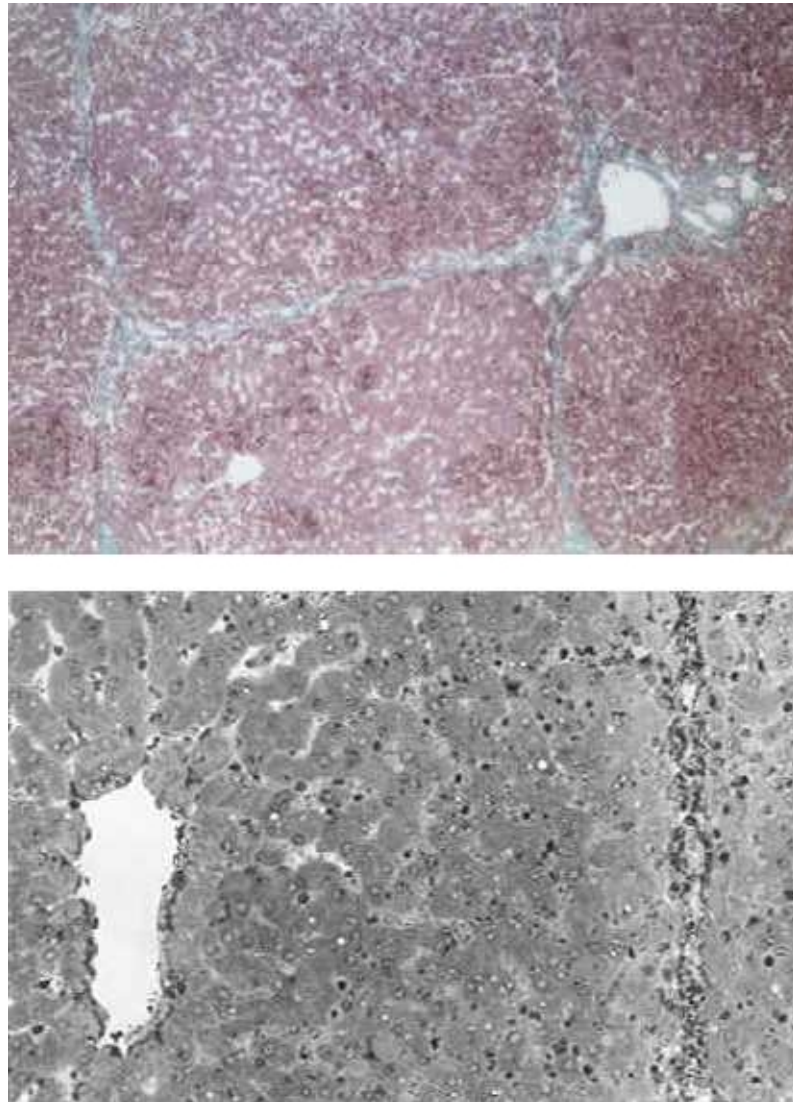


Abbildung 45: Lichtmikroskopie Gruppe 1

Paraffinschnitt: Homogene Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der Leberzellen im gesamten Läppchen. Periportal betonte Kongestion. Panlobuläre Erweiterung der Sinus.

Semidünnschnitt: Geordnete Leberzellbalken. Periportal Einzelzellnekrosen. Sinus perizentral gut abgrenzbar. Periportal schlechtere Abgrenzbarkeit der Sinus. In der Sinuslichtung Zellfragmente und pyknotische Kerne. Nur vereinzelt Zellkerne von Sinusuferzellen erkennbar. Granuläres Zytoplasma unmittelbar perizentral gelegener Hepatozyten. Im übrigen Läppchen homogenes Zytoplasma. Vereinzelt zytoplasmatische kugelförmige teils osmiophile, teils optisch leere Einschlüsse in den Hepatozyten. Regelmäßige Leberzellkerne.

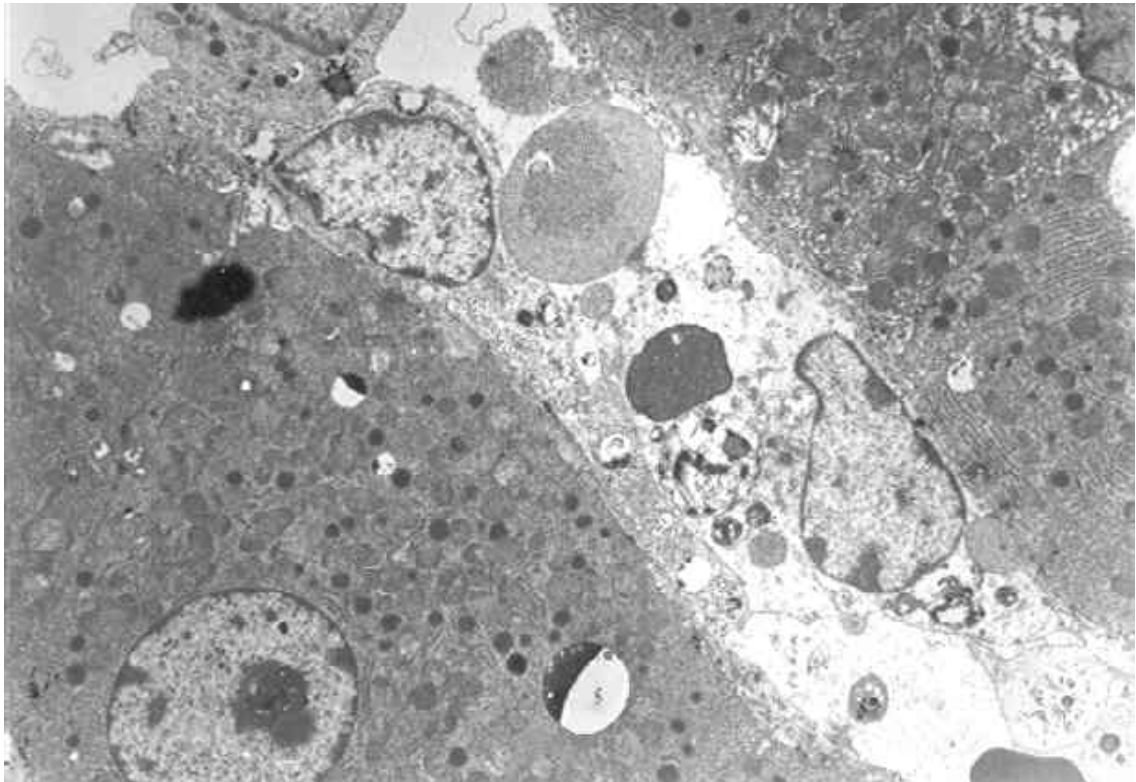


Abbildung 46: Elektronenmikroskopie Gruppe 1

Leberzellverbände mit gut abgrenzbaren Zytomembranen und typischen Gallekanalikuli. Intakte Desmosomen. Perizentral keine wesentlichen Normabweichungen der Hepatozyten, im Vergleich zu Biopsie 2 zurückgehende hydropische Schwellung. Periportal betont diskrete Schwellung des Zytoplasmas der Hepatozyten und fokale leichte Schwellung der Mitochondrien. Cristae erkennbar. Lysosomen und Peroxysomen gut abgrenzbar. Regelmäßige Leberzellkerne. Sinusuferzellen deutlich geschwollen. Fokal Kontinuitätsunterbrechungen in der Sinusauskleidung. Sinuslichtung insbesondere periportal ausgefüllt von „Blebs“ und Blutzellen. Diese sind membranbegrenzt teils granulär substrukturiert, teils enthalten sie verzweigte Membranen.

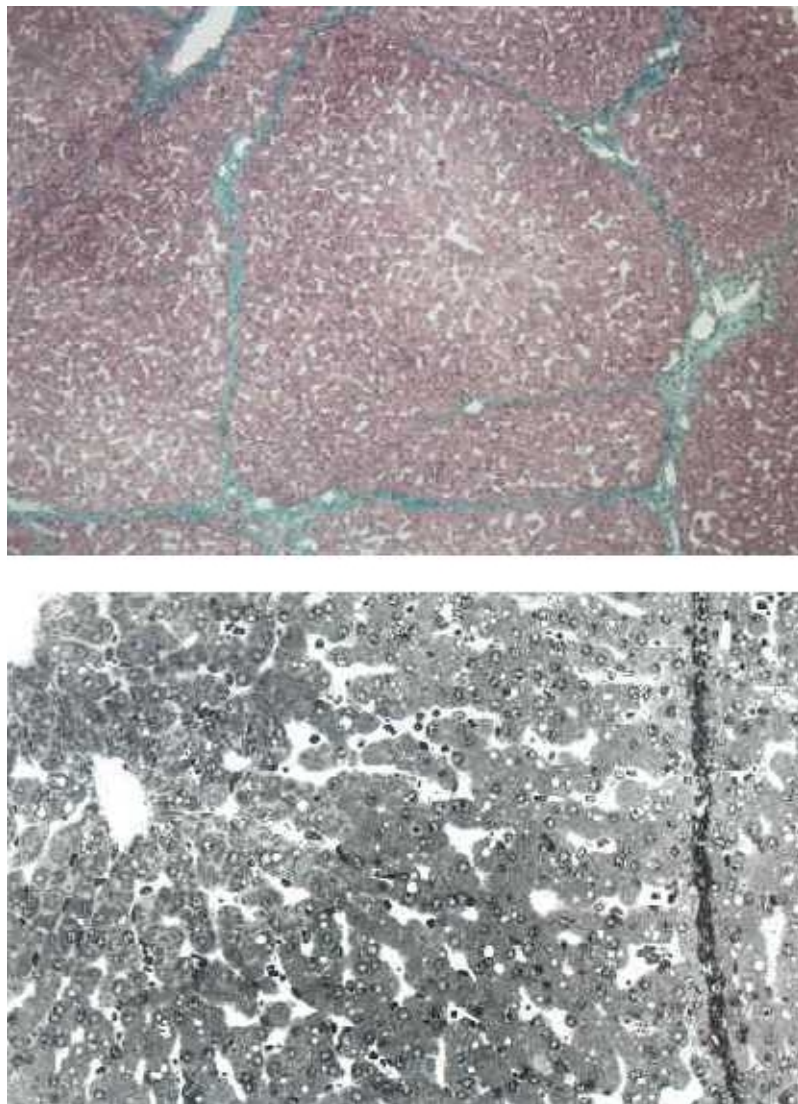


Abbildung 47: Lichtmikroskopie Gruppe 2

Paraffinschnitt: Perizentral reduzierte Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der Leberzellen und deutliche Erweiterung der Sinus. Periportal intensivere Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der Leberzellen.

Semidünnschnitt: Normale Leberzellbalken. Weite leere Sinus. Vereinzelt erkennbare Kerne von Sinusuferzellen. Verstärkte Granulierung des Zytoplasmas der Hepatozyten unmittelbar perizentral. Im gesamten Läppchen Vakuolisierung des Zytoplasmas. Normale Leberzellkerne.

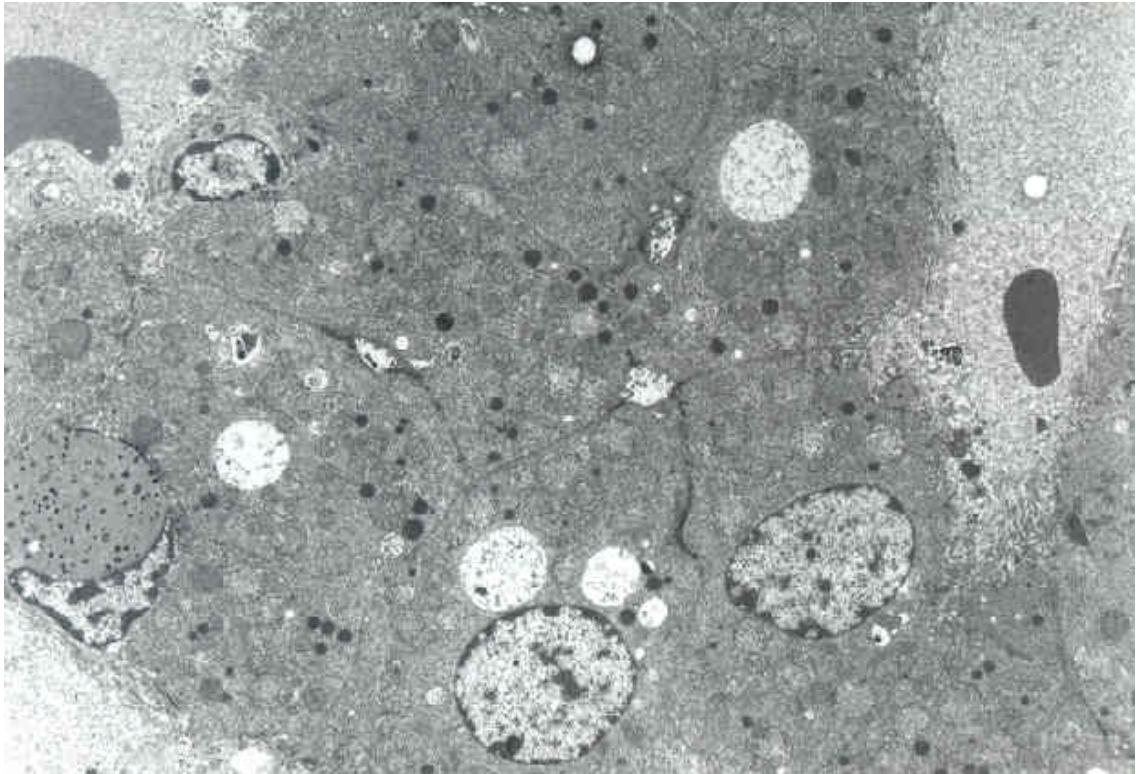


Abbildung 48: Elektronenmikroskopie Gruppe 2

Zusammenhalt der Hepatozyten intakt und Zytomembranen gut abgrenzbar. Weite offene Gallekanalikuli. Im Vergleich zu Biopsie 2 Rückgang der Schwellung und Normalisierung des Zytoplasmas der Hepatozyten panlobulär. Periportal noch residuale kugelförmige intrazytoplasmatische Vesikel und marginal betonte Cristae der Mitochondrien sichtbar. Normale Leberzellkerne. Kontinuierliche Auskleidung der Sinus durch das eindeutig abgrenzbare Endothel mit leichten Kontinuitätsunterbrechungen. Periportal leichte Schwellung des Endothels. Sinus perizentral fast ohne Inhalt. Periportal intrasinusoidal feingranuläres Material.

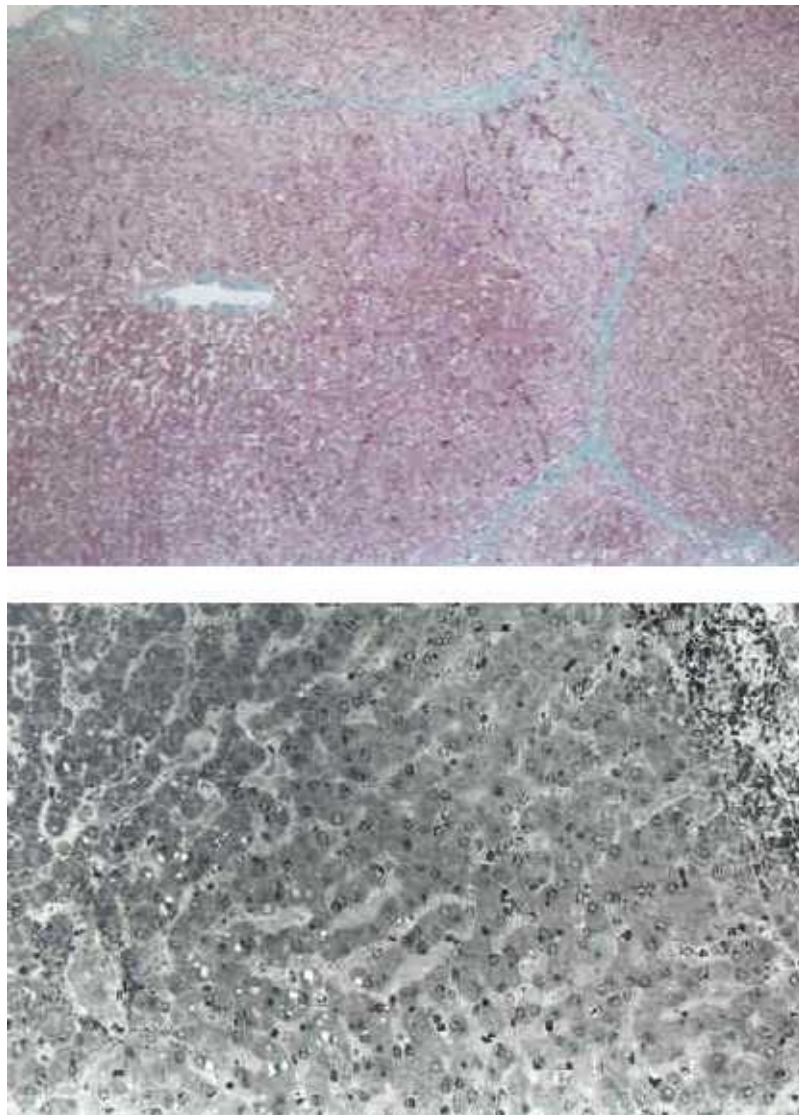


Abbildung 49: Lichtmikroskopie Gruppe 3, Biopsie2

Paraffinschnitt: Meist perizentral betont intensivere Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der Leberzellen. Perizentral mäßige Erweiterung der Sinus. Im übrigen Läppchen sehr enge Sinus.

Semidünnschnitt: Intakte Leberzellbalken. Weite mit Blut gefüllte Sinus. Wenige Kerne von Sinusuferzellen erkennbar. Zytoplasma der Hepatozyten perizentral verstärkt granuliert und geringfügig fokal vakuolisiert. Normale Leberzellkerne.

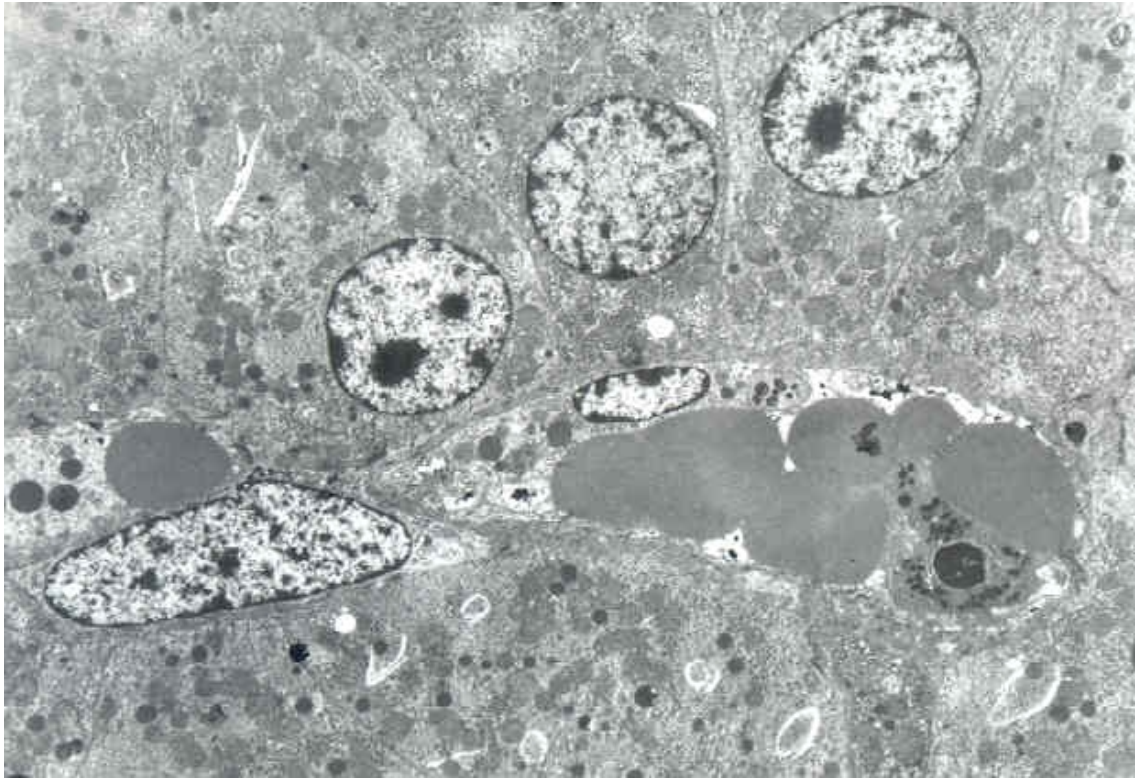


Abbildung 50: Elektronenmikroskopie Gruppe 3, Biopsie 2

Zusammenhalt der Hepatozyten erhalten. Erweiterte Disse'sche Räume. Perizentral weite Gallekanalikuli mit reduzierten Mikrovilli. Normales Zytoplasma der Hepatozyten. Mitochondrien mit deutlich elektronendichter Matrix und einzelnen Lysosomen. Normale Leberzellkerne. Sinusuferzellen mit hochgradiger Verschmälerung der Zytoplasmaausläufer sowie Kontinuitätsunterbrechungen. Periportal regelhafte Hepatozyten mit intakten Zytomembranen und englumigen Gallekanalikuli. Diffus geringfügig Glykogen im Zytoplasma sichtbar. Fokal diskrete feinvakuoläre Dilatation des endoplasmatischen Retikulums. Normal große Mitochondrien mit Überwiegen der Matrixkomponente und marginalen Cristae. Intakte Begrenzung der engen Sinus. Schwellung der Sinusuferzellen. Panlobulär deutliche Blutfülle der Sinus.

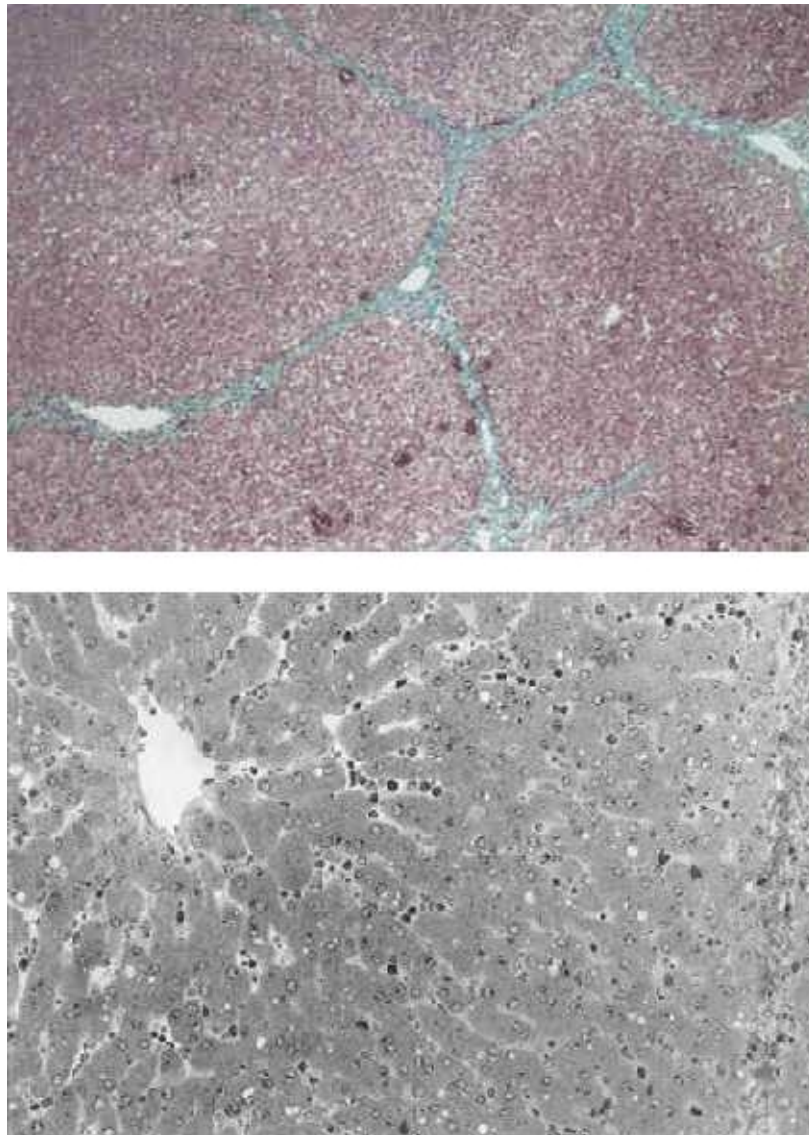


Abbildung 51: Lichtmikroskopie Gruppe 3, Biopsie 3

Paraffinschnitt: Panlobulär gleichförmige Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der Leberzellen. Vereinzelt hellere Areale. Fokale Kongestionen. Normale Sinus.

Semidünnschnitt: Sinus perizentral normal weit. Im übrigen Läppchen enger. Im Sinuslumen vermehrt Granulozyten und freie mononukleäre Zellen. Sinusuferzellen nur vereinzelt abgrenzbar. Homogenes Zytoplasma der Hepatozyten mit spärlich disseminierten Vakuolen. Normale Leberzellkerne.

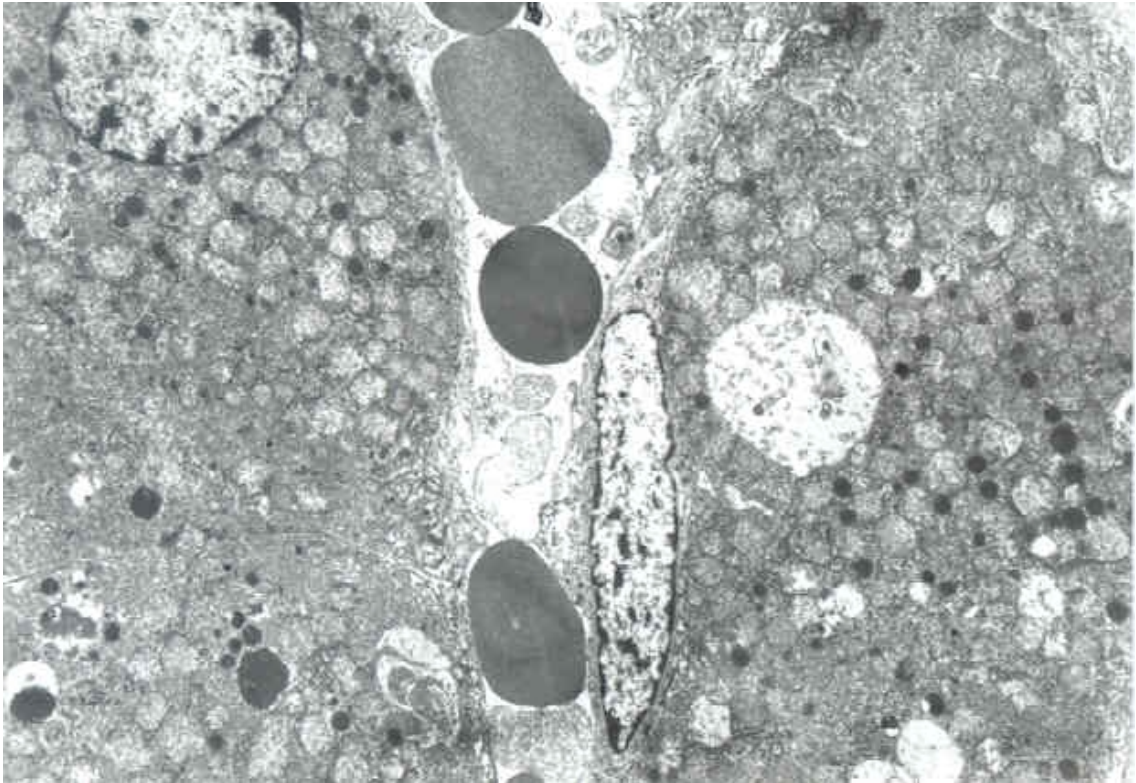


Abbildung 52: Elektronenmikroskopie Gruppe 3, Biopsie 3

Gleichartige Veränderungen in der perizentralen und in der periportalen Region. Zusammenhang der Hepatozyten intakt, mit im Vergleich zu Biopsie 2 jedoch schlechter abgrenzbaren Zytomembranen. Englumige Gallekanalikuli mit erkennbaren Desmosomen. Diffuse Schwellung des Zytoplasmas der Hepatozyten. Große intrazytoplasmatische Vakuolen, zum Teil in Konfluenz mit Lysosomen. Fokale feinvesikuläre Dilatation des endoplasmatischen Retikulums. Schwellung der Mitochondrien mit deutlicher Abnahme der Matrixkomponente. Cristae nicht erkennbar. Deutliches Hervortreten der Peroxysomen. Normale Leberzellkerne. Sinusuferzellen geschwollen. Betont periportal viele Blutzellen und Zellfragmente im Sinuslumen.

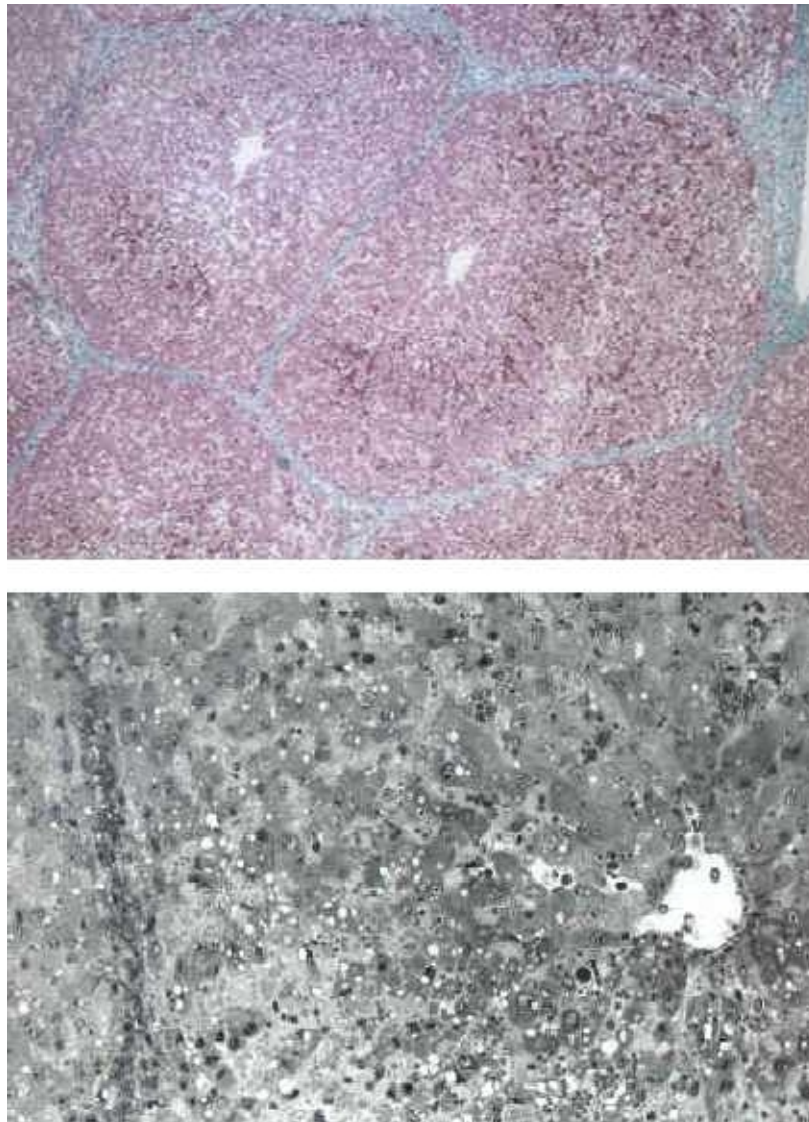


Abbildung 53: Lichtmikroskopie Gruppe 4

Paraffinschnitt: Ausgedehnte Areale mit Destruktion der Architektur in den Leberläppchen bei intakter lobulärer Grundarchitektur. Teilweise Auflösung der Leberzellbalken. Kongestionen. Sehr weite und blutreiche Sinus.

Semidünnschnitt: Unterschiedlich weit fortgeschrittene Zerstörung der Leberzellbalken. Fokal kompletter Zusammenbruch der Architektur. Gruppenzellnekrosen. Periportal betonte Dilatation und Konfluenz der Sinus mit Zellresten. Kerne von Sinusuferzellen selten nachweisbar. Deutliche panlobuläre Vakuolisierung des Zytoplasmas der Hepatozyten. Pyknotische Leberzellkerne.

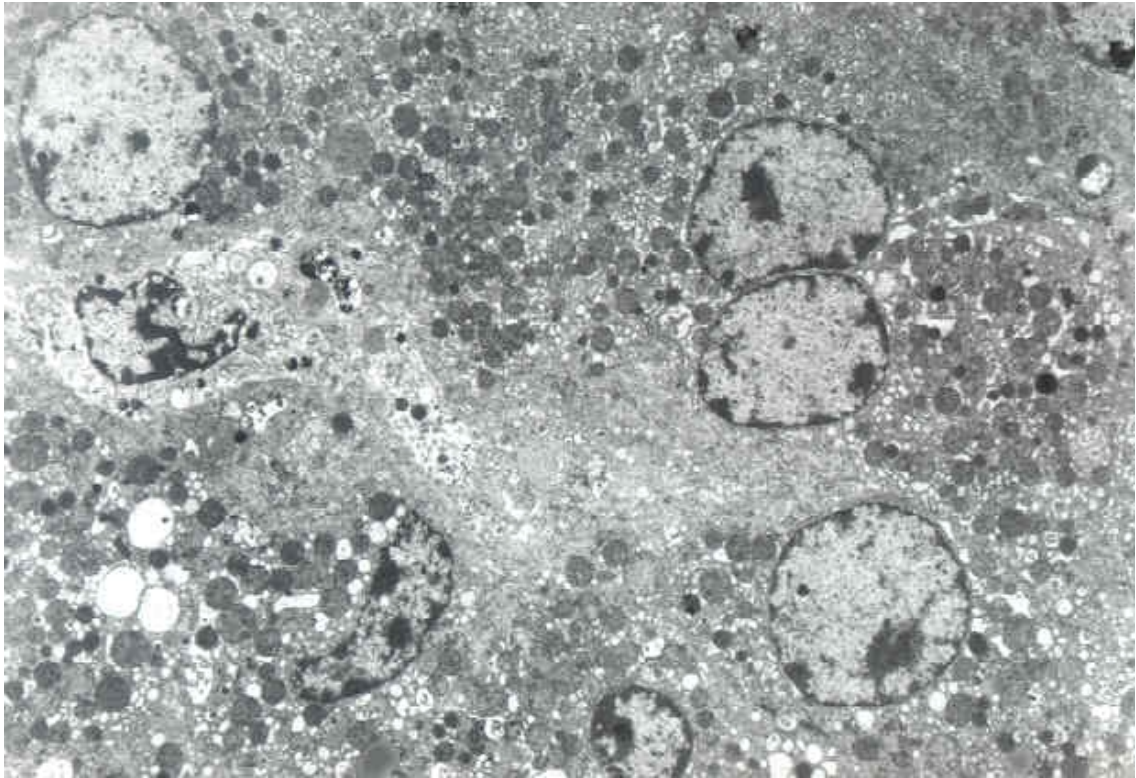


Abbildung 54: Elektronenmikroskopie Gruppe 4

Areale mit zerstörter Balkenarchitektur. Konfluenz der Hepatozyten. Auflösung der Begrenzung der Sinus und der Zytomembranen der Hepatozyten. Viele Blutzellen sichtbar. Keine Sinusuferzellen mehr abgrenzbar. Vereinzelt noch zusammenhängende Leberzellen mit feinvakuolärer Entmischung des Zytoplasmas. Mitochondrien mit teils starker Schwellung, teils mit elektronendichter Matrix. In den noch erhaltenen Arealen kohärente Leberzellverbände mit vereinzelt Zytolyseerscheinungen von Hepatozyten. Insbesondere periportal kaum erkennbare Begrenzung der Sinus vom Disse'schen Raum. Perizentral gute, periportal schlechte Abgrenzbarkeit der Zytomembranen der Hepatozyten. Enge offene Gallekanalikuli. Perizentral leichte diffuse Schwellung des Zytoplasmas der Hepatozyten mit vereinzelt Vakuolen. Mitochondrien mit marginalen Cristae. Normale Leberzellkerne. Sinusbegrenzung lückenhaft. Stark geschwollene Sinusuferzellen erkennbar. Periportal stärker ausgeprägte Schwellung des Zytoplasmas der Hepatozyten. Im Vergleich zu Biopsie 2 deutliche Steigerung der vesikulären Dilatation des REM. Normale Mitochondrien mit marginalen Cristae. Sinus ausgefüllt mit sogenannten „Blebs“ und Zellresten. Sinusbegrenzung nicht mehr linear darstellbar.

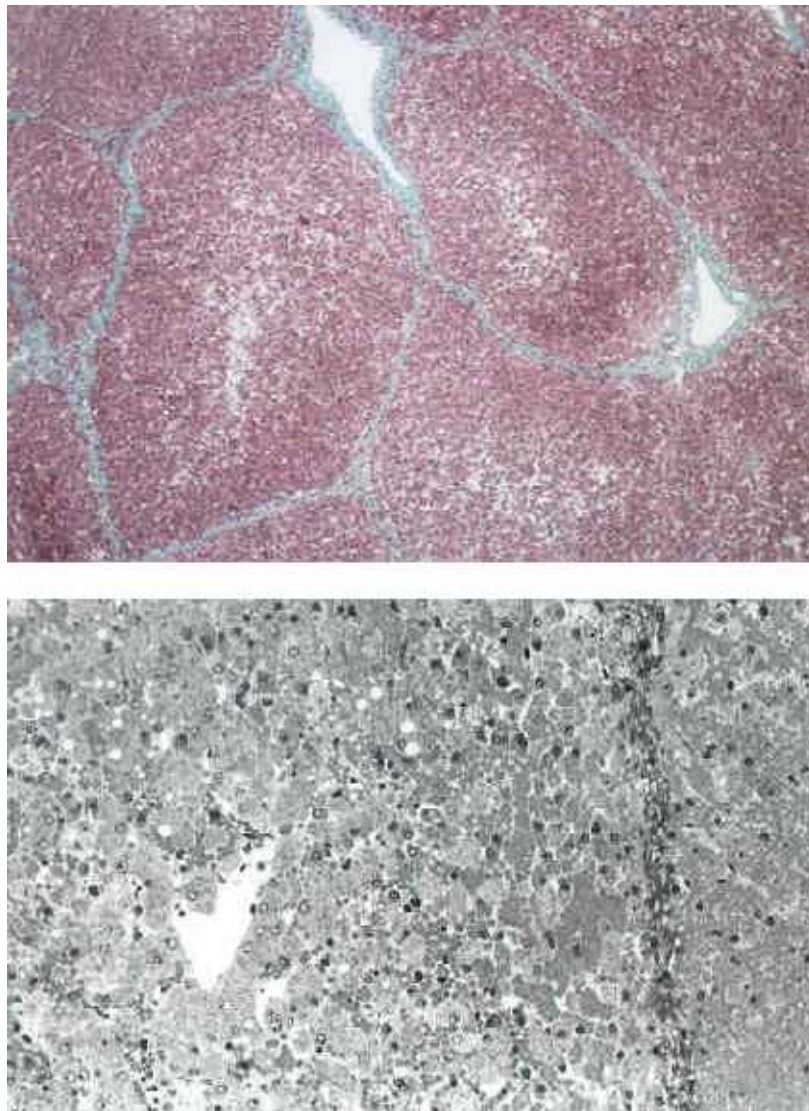


Abbildung 55: Lichtmikroskopie Gruppe 5

Paraffinschnitt: Erhaltene lobuläre Grundarchitektur. Intralobulär weitestgehende Destruktion der Leberzellbalken. Fehlende Abgrenzbarkeit der Sinus. Periportal engerer Zusammenhang der Leberzellen. Kongestionen und Einblutungen.

Semidünnschnitt: Fokal Reste der Läppchenarchitektur erhalten. Zwischen den residuellen Verbänden der Hepatozyten Massen von Erythrozyten, vereinzelte Granulozyten und nicht näher zuzuordnende Zellkerne. Weder Sinusbegrenzung noch Kerne von Sinusuferzellen erkennbar. Einzel- und Gruppenzellnekrosen. Pyknotische Leberzellkerne.

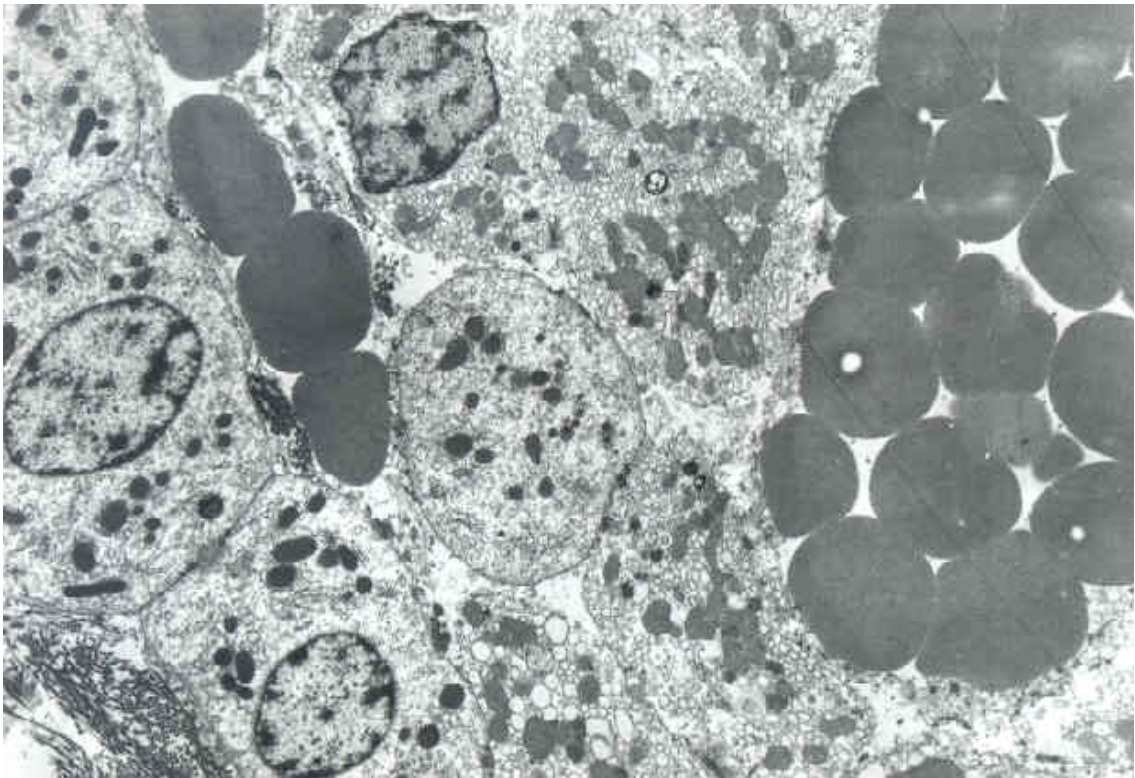


Abbildung 56: Elektronenmikroskopie Gruppe 5

Fehlender Zusammenhalt der Hepatozyten. Periportal und perizentral gleichartige Veränderungen mit teilweise vollständiger Auflösung der Leberzellverbände. Abgerundete Zytomembranen der residualen Hepatozyten abgrenzbar. Englumige desmosomal begrenzte Gallekanalikuli nur zwischen aneinander grenzenden Hepatozyten erkennbar. Hochgradige Schwellung des Zytoplasmas. Diffuse feinvesikuläre Dilatation des REM. Kleine Mitochondrien mit elektronendichter Matrix ohne erkennbare Cristae. Normale Leberzellkerne. Neben diesen residualen Hepatozyten Zusammenbrüche von Zytomembranen untergehender Hepatozyten (Zytolyse) mit Auflösung und Entleerung der Zellen in die Sinus. Sehr starke Vakuolisierung des Zytoplasmas dieser Hepatozyten. Pyknotische Leberzellkerne. Fehlende Abgrenzbarkeit der Sinusbegrenzung. Vereinzelt flache residuale Strukturen noch vorhandener Sinus. Extravasation von Erythrozyten und Einblutungen in die interepithelialen Räume. Kein eindeutiger Nachweis des Endothels oder der Ito-Zellen möglich.

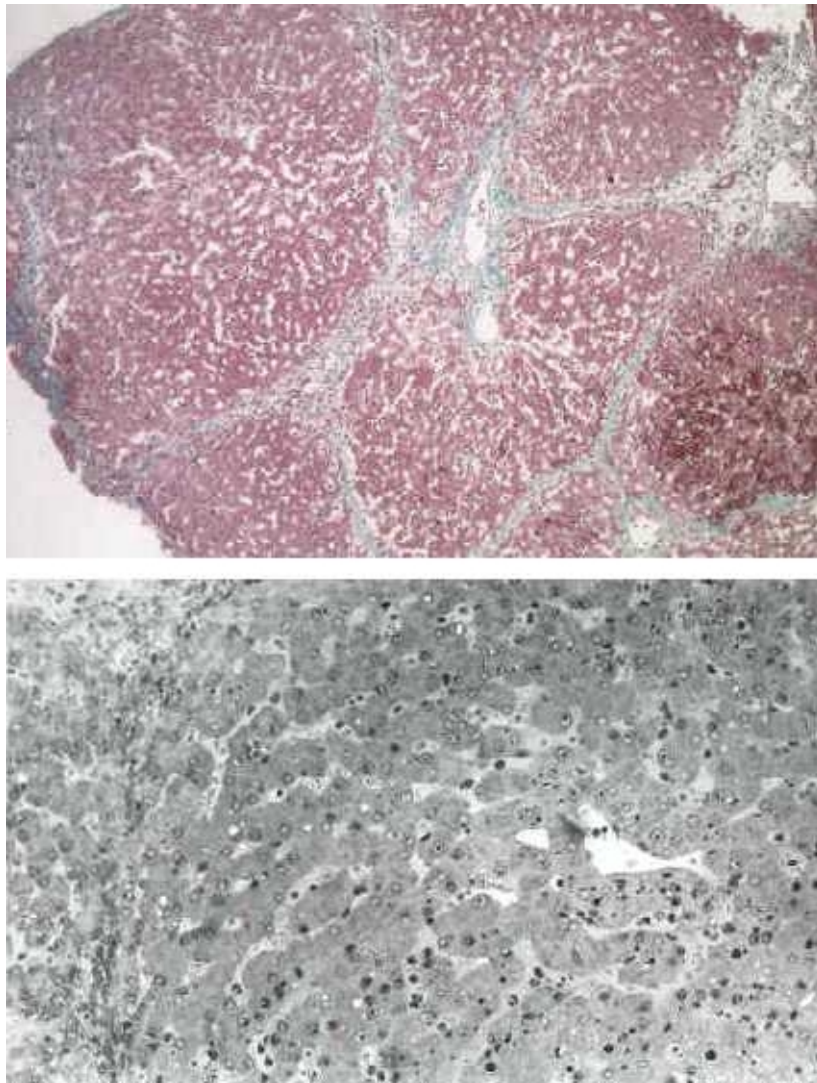


Abbildung 57: Lichtmikroskopie Gruppe 6, Biopsie 2

Paraffinschnitt: Lobuläre Läppchenarchitektur intakt. Unterschiedliche Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der Leberzellen ohne Bezug zur Läppchenarchitektur. Vereinzelt Destruktionen von Leberzellbalken. Gruppenzellnekrosen. Panlobulär weite Sinus. Periportal betonte Kongestionen. Starke Blutfülle in einem angrenzenden Leberläppchen.

Semidünnschnitt: Intakte Leberzellbalken. Weite Sinus mit intrasinusoidal auffällig vielen osmiophilen Zellkernen und zellulärem Inhalt. Vereinzelt Kerne von Sinusuferzellen erkennbar. Vereinzelt Einzelzellnekrosen. Unterschiedliche Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der Hepatozyten. Perizentral helleres granuliertes Zytoplasma, periportal osmiophileres granuliertes Zytoplasma der Hepatozyten. Vergrößerung und Kondensation des Kernchromatins der Leberzellkerne.

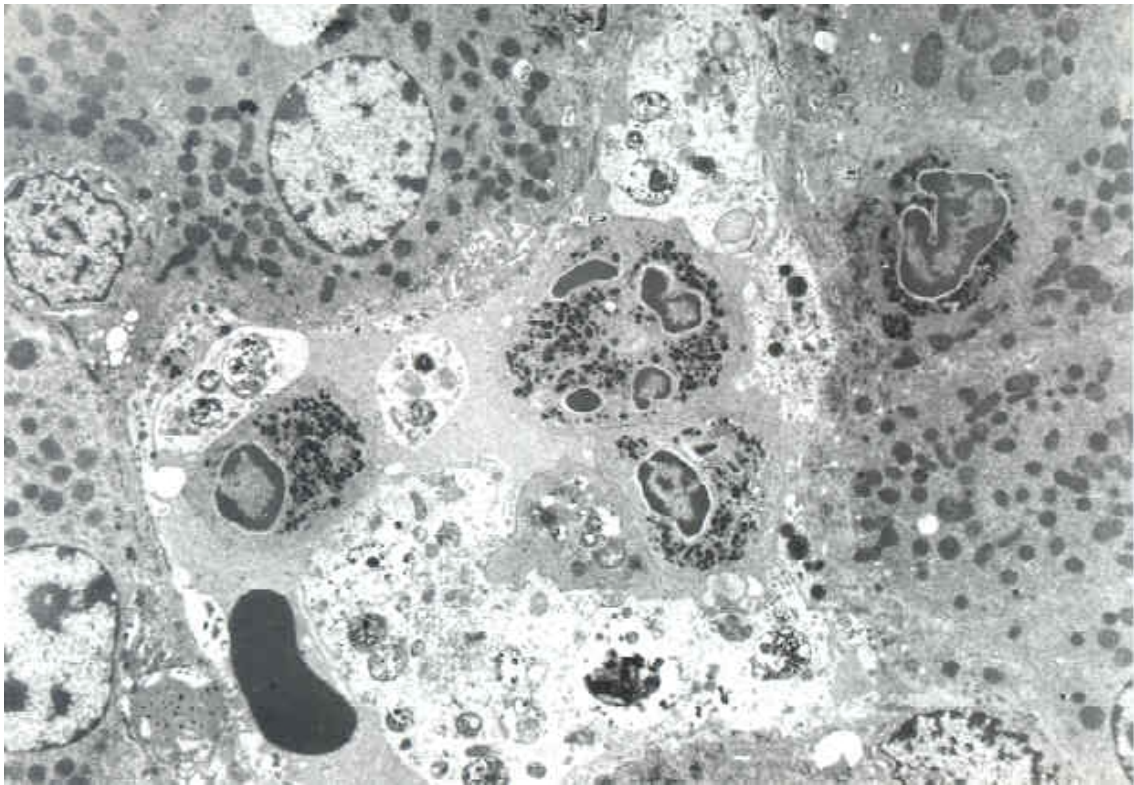


Abbildung 58: Elektronenmikroskopie Gruppe 6, Biopsie 2

Zusammenhalt der Hepatozyten und ihrer Zytomembranen gut erkennbar. Normale, teils weite Gallekanalikuli mit desmosomaler Begrenzung. Perizentral diffuse Schwellung des Zytoplasmas der Hepatozyten. Vereinzelt Lysosomen mit granulärem Inhalt und Peroxysomen sichtbar. Normal große Mitochondrien mit relativem Überwiegen der Matrixkomponente und marginal erhaltenen Cristae. Periportal mit normalem Zytosol der Hepatozyten. Kleine Mitochondrien mit elektronendichter Matrix und marginalen Cristae. Normale Leberzellkerne mit marginaler Verdichtung des Heterochromatins. Vereinzelt Prämitosen. Perizentral flache Auskleidung der leeren weiten Sinus durch Sinusuferzellen. Periportal Begrenzung der Sinus zum Disse'schen Raum nicht erkennbar. Starke Schwellung der Sinusuferzellen. Desquamationen. Sinuslumen durch granulierte Masse, Zellfragmente und vermehrt Granulozyten gefüllt. Sinusuferzellen enthalten auffällig viele intrazytoplasmatische Einschlüsse. Leukopedese von Granulozyten.

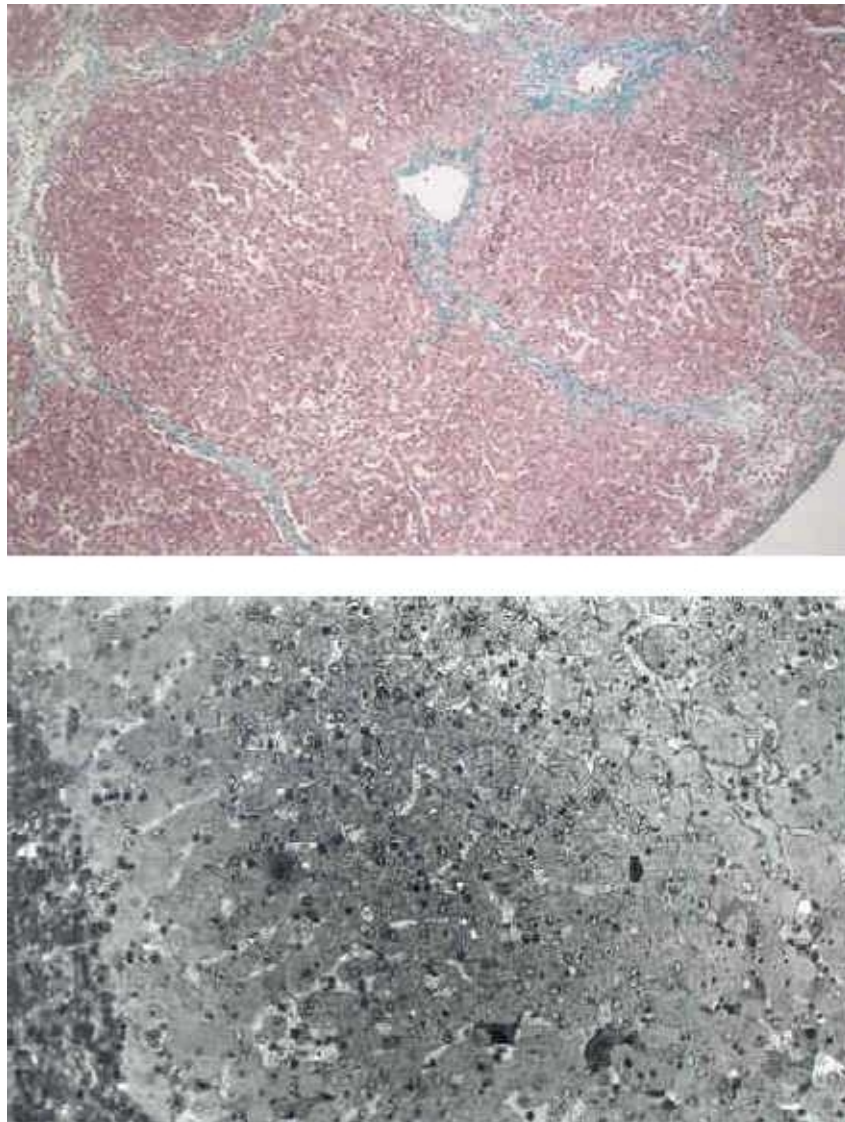


Abbildung 59: Lichtmikroskopie Gruppe 6, Biopsie 3

Paraffinschnitt: Erhaltene lobuläre Grundarchitektur. Vielfach fehlende Abgrenzbarkeit und Kontinuitätsunterbrechungen der Leberzellbalken. Fokal periportal Areale mit intensiver Anfärbbarkeit des Zytoplasmas. Perizentral betont weite und teils blutgefüllte Sinus.

Semidünnschnitt: Intralobuläre Läppchenarchitektur schwer durch die sehr engen Sinus nachvollziehbar. Intrasinusoidal viele Zellreste. Kerne von Sinusuferzellen nicht erkennbar. Einzelzellnekrosen. Vereinzelt Hepatozyten mit osmiophilem Zytoplasma und pyknotischen Kernen. Granuliertes Zytoplasma der Hepatozyten. Große osmiophile intrazytoplasmatische Einschlüsse und Kondensation des Heterochromatins der Leberzellkerne.

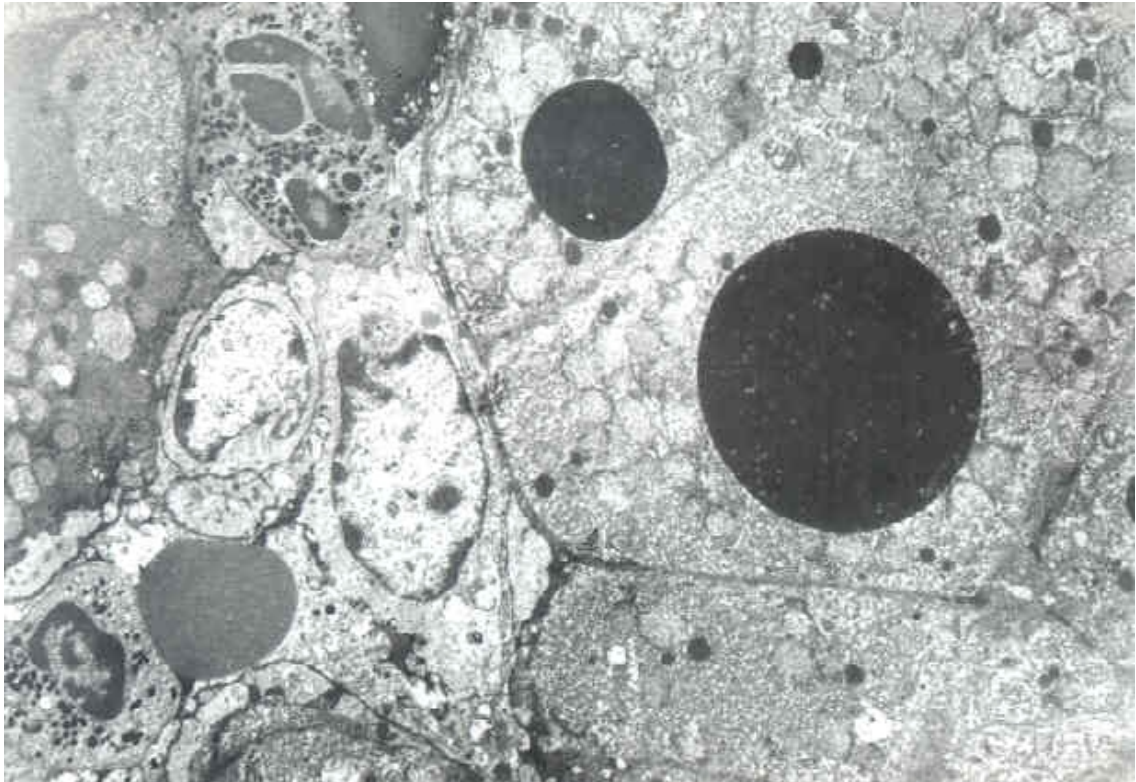


Abbildung 60: Elektronenmikroskopie Gruppe 6, Biopsie 3

Gleichartige Veränderungen in der perizentralen und periportalen Region. Sehr enger Zusammenhalt der Hepatozyten. Zytomembranen der Hepatozyten deutlich sichtbar. Sehr enge, desmosomal begrenzte Gallekanalikuli. Begrenzung der Sinus zum Disse'schen Raum nicht erkennbar. Wenige Mikrovilli am Sinuspol der Hepatozyten. Leichte diffuse Schwellung des Zytoplasmas der Hepatozyten mit vereinzelt, riesigen, intrazytoplasmatischen elektronendichten Einschlüssen (große Lysosomen). Einige Lysosomen und betont periportal viele Peroxysomen erkennbar. Teilweise beginnende Neuordnung der Zellorganellen in den Hepatozyten (Mitochondrien – feingranuläres Material). Leicht geschwollene Mitochondrien mit vereinzelt randständigen Cristae. Normale Leberzellkerne. Vereinzelt Hepatozyten mit homogenem, elektronendichtem Zytoplasma und ohne nachweisbarem Zellkern. Zytomembraneinbrüche von Hepatozyten sichtbar. Leukopedese von Granulozyten. Starke Schwellung der Sinusuferzellen. Durch die engen Sinus schlechte Abgrenzbarkeit der Sinusuferzellen. Lumen der Sinus mit Zellfragmenten, elektronendichter Masse und Granulozyten gefüllt.

Zusammengefaßt zeigten in der Biopsie 3 -eine Stunde nach Reperfusion im Empfängertier-, jene Gruppen die größten Veränderungen der intralobulären Architektur, deren Lebern zuvor einer Stunde warmer Ischämie ausgesetzt wurden (Gruppen 4-6). Am stärksten betroffen war Gruppe 5, auch was die Extravasation von Erythrozyten, als Ausdruck beginnender Auflösung der intraendothelialen-hepatozellulären Verbände, betrifft (Tabelle 9). Für eine weitere Beurteilung der morphologischen Ergebnisse, ist eine Unterteilung in endotheliale und hepatozelluläre Schäden zweckmäßig. Die Schwellung der Hepatozyten war in Gruppe 4 und 5 am stärksten ausgeprägt während die Mitochondrien in Gruppe 5 weniger stark geschwollen waren.

Den größten morphologischen Schaden wies jedoch das Endothel der Gruppe 5 auf. Es war eine Stunde nach Reperfusion in praktisch allen Schnitten nicht mehr nachweisbar.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Vollständigkeit der intra- lobulären Architektur	0	0	0	--	---	-
Extravasation von E- rythrozyten	0	0	0	--	---	0
Schwellung der Hepatozyten	-	-	- / --	---	---	- / --
Schwellung der Mitochondrien	-	0	-	---	-	-
Desquamation des Sinusendothels	0	0	0	--	n.d..	0
Schwellung des Sinusendothels	--	-	--	---	n.d..	--

Tabelle 9: Zusammenfassung der morphologischen Ergebnisse nach Lebertransplantation in den Gruppen 1 bis 6 (Biopsie 3). Keine Veränderungen: 0, geringe Veränderungen: -, mittlere Veränderungen: --, ausgeprägte Veränderungen: ---, n.d.: nicht differenzierbar

4. DISKUSSION

Der Mangel an geeigneten Spenderorganen hat im vergangenen Jahrzehnt zu einer intensiven Suche geführt, die Anzahl an transplantablen Organen zu erhöhen. Die vorliegende Arbeit soll eine Antwort darauf geben, ob die normotherme extrakorporale Leberperfusion eine geeignete Methode ist, Lebern zu konservieren und die Nutzung von NHBD zu ermöglichen. Im ersten Abschnitt wird die Optimierung der NELP durch die Integration einer simultanen Perfusatdialyse behandelt. Im zweiten Abschnitt wird untersucht ob die kalte Konservierung in UW im Vergleich zur NELP geeignet ist, Lebern von NHBD zu konservieren.

4.1 Zur Wahl des Schweins als Versuchstier

Um eine Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf einen möglichen klinischen Einsatz zu erlauben, kommen der Wahl des Versuchsmodells sowie des Versuchstiers besondere Bedeutung zu.

Wichtige Erkenntnisse zum Ablauf der Schadenskaskade unter ischämischen Bedingungen stammen aus der Kultur isolierter Hepatozyten und Sinusendothelzellen⁸⁴⁻⁸⁶. Der Ausschluß von Einflußfaktoren ist es, der diese Modelle für mechanistische Untersuchungen besonders prädestiniert. Aber gleichzeitig leidet hierunter auch deren Übertragbarkeit auf eine an Einflüssen reiche Situation im gesamten Organismus bzw. bei der klinischen Anwendung. Somit scheiden Modelle auf Basis isolierter Zellen für die anfangs erwähnten Zielsetzungen aus.

Ein besonders häufig genutztes Versuchstier in der Konservierungsforschung sowohl im Leberperfusionsmodell⁸⁷⁻⁸⁹, als auch im Transplantationsversuch^{90,91} ist die Rattenleber. Neben den zahlreichen Vorteilen^{92,93}, wie z.B. die unproblematische Tierhaltung, die verhältnismäßig geringen Kosten, die minimalen personellen Anforderungen, die vergleichsweise einfache Operationstechnik und Narkoseführung, gibt es bezüglich der Übertragbarkeit auf die humane Situation wichtige Unterschiede. Hierzu zählt zunächst die Größendiskrepanz. Des weiteren haben Rattenlebern keine Gallenblase mit den daraus folgenden Unterschieden in der Physiologie der Gallesekretion. Bemerkenswert ist ferner, daß Rattenlebern erfolgreich transplantiert werden können, auch wenn auf die arterielle Anastomose verzichtet wird⁹⁴. Dies ist bisher für kein Säugetiermodell beschrieben. Nicht zuletzt scheinen Rattenlebern im Unterschied zu humanen Lebern mit 48h eine besonders lange Toleranz gegenüber kalter Ischämie aufzuweisen⁹⁵.

Zahlreiche Konservierungsuntersuchungen wurden an Hundelebern durchgeführt^{96,97}. Die präklinische Entwicklung der University of Wisconsin-Lösung basiert zum großen Teil auf Versuchen im Hundelebertransplantationsmodell⁹⁸. Aufgrund restriktiver tier-schutzrechtlicher Vorschriften und wegen des öffentlichen Interesses an Versuchen mit Haustieren stehen nur wenige Hunde für die Forschung zur Verfügung.

Ausschlaggebend für die Wahl des Schweins als Versuchstier war neben der physiologischen und anatomischen Ähnlichkeit zum Menschen⁶⁶ auch die gute Verfügbarkeit⁹⁹. Die Immunsuppression bei der Schweinelebertransplantation ist von geringerer Bedeutung als in anderen Säugetiermodellen, da Abstoßungsreaktionen oftmals auch dann nicht auftreten, wenn die Tiere gar nicht immunsupprimiert wurden^{100,101}. Schweine sind als Versuchstiere in zahlreichen Leberstudien als Modell genutzt worden^{100,102}. Das prä- und postoperative Handling von Schweinen ist mehrfach beschrieben^{66,99,103}. Die Stabilisierung des Kreislaufs ist schwieriger als beim Hund, aber ausreichend standardisierbar¹⁰⁴.

4.2 Verbesserung der NELP

Die Größe von Schweinelebern und die daraus resultierenden Flußvolumina machen ein Perfusionssystem erforderlich, indem das Perfusat rezirkuliert. Eine 700g schwere Leber wird pro Minute mit ca. 70 ml Flüssigkeit durchspült. Daraus berechnet sich pro Stunde ein Umsatz von 42 Litern Perfusat.

Alle von der Leber abgegebenen Substanzen - sei es durch Zelluntergang oder als Metabolite im Rahmen von Stoffwechselvorgängen - akkumulieren im Perfusionsmedium. Besonders anschaulich ist dies beim Kalium: die Reperfusion einer ischämisch geschädigten Leber führt in Abhängigkeit von der Ischämiedauer und der Temperatur zu einem Austritt von Kalium aus dem intrazellulären Raum ins Perfusat. In einem rezirkulierenden System verbleibt das Kalium im Perfusat und kann Konzentrationen weit oberhalb des physiologischen Bereichs erreichen. Die Kaliumkonzentration ist für die Volumenregulation von Hepatozyten von Bedeutung¹⁰⁵. Das Zellvolumen wiederum steuert die Proteinsynthese¹⁰⁶. Um weder eine Hepatozytenschwellung noch eine Schrumpfung zu verursachen und somit möglichen Reparationsvorgängen günstige Voraussetzungen zu schaffen, sind physiologische Kaliumkonzentrationen anstrebenswert^{107,108}. Für Rattenleberperfusionen aus einem Reservoir ist dieses Ziel leicht zu erreichen. Die gewünschte Kaliumkonzentration wird dem Perfusat, meist Krebs-Henseleit, vorgegeben.

Vor diesem Hintergrund wurde ein Dialysekreislauf in den rezirkulierenden Schweineleberperfusionssysteme integriert. In der Literatur sind bisher keine Leberperfusionssysteme mit integrierter Dialyse beschrieben. Folglich fehlen bisher auch Hinweise, ob die Dialyse des Perfusats tatsächlich günstige Auswirkungen auf die Leberfunktion hat.

Abbildung 1 zeigt den für diese Untersuchungen gewählten Perfusionssystem. Der Dialysator wurde im Bypass angeschlossen. Ein Fünftel des durch die Leber perfundierten Flußvolumens wurden entnommen und durch den Dialysator geleitet. Das Dialysat wurde rezirkulierend aus einem 10 Liter fassenden Behälter gepumpt. Es wurde ein definiertes Dialysatvolumen gewählt, um die Bilanzierung und Volumenverschiebungen sowie die Konzentrationsberechnungen leichter durchführen zu können. Folglich führt diese Form der Dialyse zu einer Vergrößerung des Verteilungsvolumens von

4l auf insgesamt 14l (4l Perfusat plus 10l Dialysat) für alle frei dialysierbaren Substanzen. Somit werden aus dem Perfusionskreislauf keine Komponenten entzogen sondern lediglich verdünnt.

Wie die Kaliumkonzentrationen der Gruppe 1 zeigt (Abbildung 13), kommt es 30 min nach Reperfusion zu einer Zunahme der Kaliumkonzentration von $5,0 \pm 0,1$ auf $6,8 \pm 0,6$ mmol/l. Nach 3 Stunden Perfusion ist eine Kaliumkonzentration von 7,9 mmol/l erreicht. Im Unterschied hierzu fällt die Kaliumkonzentration in Gruppe 2 von 5,0 auf 4,1 mmol/l ab. Parallel hierzu steigt sie im Dialysat an. Wie erwartet konnte der angeschlossene Dialysekreislauf die Kaliumkonzentration der Gruppe 2 im physiologischen Konzentrationsbereich halten. Die Unterschiede der Kaliumkonzentrationen beider Gruppen waren zu allen Zeitpunkten signifikant. Nach Berechnung der Kaliumfreisetzung zeigte sich, daß die Lebern in Gruppe 2 nach 3 Stunden signifikant weniger Kalium verloren hatten (Abbildung 14). Dies war kein Reperfusionssphänomen, sondern offensichtlich Folge einer kontinuierlichen Kaliumfreisetzung. Die Freisetzung von Kalium während der Perfusion weist auf Zellmembrandefekte hin, welche vermutlich durch freie Sauerstoffradikale verursacht werden^{109,110}. Die geringere Kaliumfreisetzung kann als ein erstes Indiz für eine bessere Perfusionsqualität in Gruppe 2 gewertet werden.

Während die Konzentration für Natrium weder in Gruppe 1 noch in Gruppe 2 nennenswerten Variationen unterworfen war (Abbildung 12), gab es für den pH Wert signifikante Unterschiede (Abbildung 15). Unter physiologischen Bedingungen spielt die Leber, neben den Nieren, eine zentrale Rolle in der Regulation des pH-Werts^{111,112}. Durch die Synthese von Harnstoff aus Bikarbonat kommt es im Verlauf der extrakorporalen Leberperfusion im geschlossenen Kreislauf zu einem Absinken des pH-Werts¹¹³. Zwar läßt sich der pH durch Bikarbonatgabe äquilibrieren, dies hat aber zur Folge, daß die Natrium- oder Kaliumkonzentration durch die Zugabe von Natrium- bzw. Kaliumbikarbonat nicht konstant gehalten werden können. $(H)^+$, $(OH)^-$ und Harnstoff passieren leicht die Dialysatormembran. Somit führt die Dialyse zu einem Ausgleich des pH Wertes zwischen Perfusat und Dialysat. Zu allen Meßzeitpunkten befand sich der pH in Gruppe 2 im physiologischen Bereich um 7,4, während am Ende der Perfusion in Gruppe 1 ein Wert von 6,86 erreicht war. Dies erklärt sich durch die Pufferkapazität des Dialysats, das Bikarbonat als Puffer beinhaltet. In der Literatur gibt es Studien die zeigen, daß ein physiologischer pH für die meisten Stoffwechselvorgänge wichtig ist. Dies gilt auch für die extrakorporale Leberperfusion¹¹⁴.

Um zu beurteilen, ob die Dialyse des Perfusats Auswirkungen auf die Qualität der Leberperfusion hat, wurde die Aktivität von GOT, GPT und LDH ermittelt, der Sauerstoffverbrauch bestimmt sowie die Gallebildung und Harnstoffproduktion gemessen.

Die Enzyme können wegen ihres Molekulargewichts die Dialysatormembran nicht passieren. Deshalb wurde bei allen Bestimmungen zu keinem Zeitpunkt im Dialysat Transaminasenaktivität nachgewiesen. Somit kann gefolgert werden, daß die höheren Enzymaktivitäten der Gruppe 1 das Resultat einer vermehrten Freisetzung sind. Bei allen Bestimmungen wurden die höheren Aktivitäten in Gruppe 1 gemessen. Zum Teil waren diese Unterschiede zwischen den beiden Gruppen signifikant (Abbildung 16-18). Hier-

aus läßt sich folgern, daß die Lebern in Gruppe 2 während des Perfusionszeitraums einen geringeren hepatozellulären Schaden aufwiesen als in Gruppe 1.

Ein Unterschied im Sauerstoffverbrauch beider Gruppen wird erst nach der 90igsten Minute deutlich und erreicht nach 180 Minuten gerade das Signifikanzniveau ($p=0,044$). Der höhere Sauerstoffverbrauch der Gruppe 2 kann als ein weiteres Indiz dafür gewertet werden, daß die Leberperfusion mit dialysierten Perfusat zu einer besseren Perfusion führt. In zahlreichen Leberperfusionsstudien wird der Sauerstoffverbrauch als Viabilitätskriterium gewertet¹¹⁵.

Der zuverlässigste Parameter zur Beurteilung der Leberfunktion ist die Galleproduktion¹¹⁶. Sie erfordert eine intakte Leberläppchen-Architektur. Zahlreiche biochemische Abläufe müssen ineinander greifen, bis Galle produziert werden kann. Die Sekretion von Galle beruht im wesentlichen auf aktiven Transportmechanismen^{117,118}.

Die Menge an produzierter Galle in Gruppe 1 betrug 1,1 ml pro 100g Lebergewicht. In Gruppe 2 wurden hingegen 1,9 ml von der gleichen Anzahl Hepatozyten sekretiert (Abbildung 20). Der Unterschied war mit $p=0,016$ signifikant. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Dialyse des Perfusats zu einer Steigerung der Gallesekretion führt, auch die Produktion von Harnstoff war in Gruppe 2 höher, wenngleich nicht signifikant (Abbildung 22).

Werden alle Schädigungsparameter und Viabilitätskriterien zusammengefaßt, kann gefolgert werden, daß die Dialyse des rezirkulierenden Perfusats in Gruppe 2 zu einem geringeren hepatozellulären Schaden und einer besseren Leberfunktion führt. Somit scheint es erwiesen, daß die Integration der Dialyse in den Leberperfusionskreislauf einen erheblichen Beitrag für eine gute Leberfunktion leistet. Zu berücksichtigen bleibt, daß es sich im obigen Modell um Lebern handelte, die einer warmen Ischämie ausgesetzt waren. Sowohl die Freisetzung an Kalium, aber auch an sauren Valenzen ist unter diesen Bedingungen besonders groß. Wahrscheinlich wäre der positive Einfluß der Perfusatdialyse mit frisch entnommenen Lebern weniger stark ausgefallen oder hätte erst später eingesetzt.

Die Ursachen für die bessere Leberfunktion lassen sich anhand des obigen Modells nicht zweifelsfrei klären. Vergleichsweise unstrittig dürfte die Bedeutung einer physiologischen Kaliumkonzentration sein. Ähnliches muß man für den pH annehmen.

Weitaus spekulativer ist die Annahme, daß die Leber unter physiologischen Bedingungen z.B. über Glukuronidierung in der Lage ist Toxine, in hydrophile Substanzen umzuwandeln^{119,120,121}. Es ist denkbar, daß diese Toxine, die auch bei der humanen Nierendialyse erfolgreich über Jahre hinweg eliminiert werden können, im Leberperfusionskreislauf nicht mehr akkumulieren, bzw. in ihrer Konzentration reduziert werden.

Für die obigen Untersuchungen wurde die Leber in ein temperiertes Perfusatbad gelegt (Abbildung 1). Diese Lagerung stellt einen Kompromiß zwischen einem einfachen Perfusionsaufbau und der Perfusionskammer, wie sie von Neuhaus entwickelt wurde, dar. Legt man die Leber auf eine harte Unterlage, sei es auch ein Netz, Tuch oder ähnliches, führt das Eigengewicht der Schweineleber dazu, daß die unteren 2-3cm des Lebergewebes komprimiert werden. Als Folge bleiben diese Areale hypoperfundiert.

Neuhaus konnte zeigen, daß durch die Lagerung in einer geschlossenen Perfusionskammer auf die von außen oszillierende, sinusförmige Drucke gegeben werden, verhindert wird, daß es zu einer Ausbildung dieser Areale kommt. Lebern, die in einer solchen Kammer perfundiert wurden, produzieren bis zur 24 Stunden Galle als Zeichen einer guten Funktion⁴⁴. Das Prinzip der Perfusatdialyse wurde in einer experimentellen Perfusionsmaschine mit dem Prinzip der Kammerperfusion vereint. Wir konnten in einer Studie mit Affenlebern zeigen, daß es über einen Perfusionszeitraum von 4 Stunden zu keinem nennenswerten Anstieg der Transaminasen kam und die Lebern bis zum Schluß große Mengen Galle produzierten¹²².

Diese experimentelle Perfusionsmaschine war jedoch nicht geeignet, Schweineleberperfusionen unter sterilen Kautelen durchzuführen. Auch das Handling in Bezug auf Volumenverschiebungen in Dialysat oder Perfusat sowie das Monitoring der Drucke und Flüsse bedurfte einer Neukonstruktion wie sie Kapitel 2.2.6 beschrieben wird. Die Abbildung 8 und Abbildung 9 zeigen die neu entwickelte Perfusionsmaschine mit integriertem Dialysekreislauf und der Neuhaus-Kammer. Das Flußdiagramm ist in Abbildung 10 skizziert. Diese Perfusionsmaschine kam im vorliegenden Projekt erstmals zum Einsatz.

4.3 Lebertransplantation nach NELP

Alle experimentellen Aussagen über die Qualität einer extrakorporalen Leberperfusion beruhen bisher auf indirekten Daten. Dies sind, wie eingangs geschildert, die Freisetzung von Enzymen, die Produktion von Harnstoff, Verbrauch von Sauerstoff und die Sekretion von Galle. Zusammengefaßt ergeben diese Daten einen guten Hinweis auf die Funktionsfähigkeit der Leber, lassen aber trotzdem einen gewissen Interpretationsspielraum zu. Der absolute Beweis, daß die extrakorporale Leberperfusion besonders physiologisch durchgeführt wurde, kann aber nur die anschließend erfolgreiche Transplantation einer zuvor extrakorporal perfundierten Leber sein. Nur dieser Versuchsaufbau läßt auch weitergehende Überlegungen zur Anwendung der NELP zu. Insbesondere muß man für die mögliche Anwendung der NELP zur Nutzung von Lebern, die von NHBD stammen fordern, daß es experimentell möglich ist, diese Lebern zu transplantieren.

In der gesamten Literatur findet sich nur eine Publikation, in welcher der Versuch unternommen wurde nach NELP zu transplantieren¹²³. Von 4 transplantierten Schweinen haben 2 Tiere einige Tage überlebt. Leider fehlen genauere Angaben, die Schlußfolgerungen zuließen. Trotz der zahlreichen Rattenleberperfusionen und auch Rattenlebertransplantationen gibt es keine Daten über die Transplantation nach vorheriger NELP. Die Ziele beim Entwurf des vorliegenden Studienprotokolls waren es, unzweideutige Schlüsse in Bezug auf die Viabilität der Leber nach NELP zuzulassen und zum anderen eine Situation zu simulieren, die eventuellen Einsätzen in der Klinik entsprechen könnte.

Die Lebern der ersten drei Gruppen des Versuchsprotokolls wurden einem herzschlagenden Spendertier entnommen. Eine definierte warm ischämische Phase im Spender fehlte somit. Der Versuchsgruppenaufbau ist in Abbildung 6 schematisch wiedergegeben. In Gruppe 1 wurde sofort nach Entnahme der Spenderleber das vorbereitete Empfängertier transplantiert, in Gruppe 2 erst nach 4 Stunden Organkonservierung in UW. Für die klinische Organprotektion ist die Kaltkonservierung in UW- oder HTK-Lösung der Standard, gegen den neue Verfahren gemessen werden müssen. Für das Studienprotokoll wurden deshalb zwei der Vergleichsgruppen bestimmt (Gruppen 2 und 5) in denen die Lebern 4 Stunden in UW-Lösung kalt konserviert wurden. In Gruppe 3 wurden die Lebern über 4 Stunden normotherm extrakorporal perfundiert und anschließend transplantiert. Die Gruppen 4 bis 6 entsprachen nach 60 Minuten warmer Ischämie im Spendertier dem NHBD Konzept. In Gruppe 4 schloß sich an die 60 Minuten warme Ischämie die sofortige Transplantation an. Somit waren diese Lebern einer kontinuierlichen warmen Ischämie von 103 Minuten ausgesetzt. In Gruppe 5 und Gruppe 6 folgten den 60 Minuten warmer Ischämie 4 Stunden kalte Ischämie in UW bzw. 4 Stunden NELP.

Der Zeitraum von vier Stunden wurde gewählt, weil dies in etwa der kürzeste Zeitraum sein dürfte, der es erlaubt, die Spenderhepatektomie durchzuführen, den NELP-Kreislauf zu füllen sowie den Empfänger vorzubereiten und zu hepatektomieren. Dieses Vorgehen beruht auf einigen Prämissen, auf die am Ende der Diskussion nochmals im Einzelnen eingegangen wird.

4.4 Überlebensdaten nach Lebertransplantation

In Gruppe 1 überlebten alle Schweine die Transplantation. Ein Leberausfall trat wie zu erwarten war in keinem Fall auf. Eine operationstechnisch bedingte durchschnittliche warme Ischämie von 3 min wird von Lebern gut toleriert¹²⁴. Diese Gruppe diente als Referenz ohne kalte Ischämie oder NELP, dem Vergleich der biochemischen Verlaufsmeßgrößen sowie zur Auswertung der licht- und elektronenmikroskopischen Beurteilung.

4 Stunden kalte Ischämie in UW gelten als kurzes Konservierungsintervall, folglich überlebten auch in der Gruppe 2 alle Schweine die Transplantation ohne Leberausfall. Ebenfalls nach NELP kam es zu keinen Leberausfällen. Somit kann im Vergleich der Gruppen 2 und 3 erstmals gefolgert werden, daß für das Überleben der Empfänger die Konservierung über ein vierstündiges Intervall in UW im Vergleich zur NELP keine Vorteile bietet.

Die Aktivität der Enzyme (Abbildung 23:-26) sind in Gruppe 3 etwas höher als in Gruppe 2. Dies läßt auf einen geringfügig stärkeren hepatozellulären Schaden schließen, der sich auch morphologisch überwiegend perizentral durch eine verstärkte Granulierung und eine leichte fokale Vakuolisierung andeutet (Abbildung 49 und 51). Dies ist darauf zurückzuführen, daß vor Anschluß an die NELP diese Lebern einer kurzen warmen Ischämie von ca. 10 Minuten und nach Herausnahme aus der Perfusionsma-

schine operationstechnisch bedingt einem Intervall von weiteren 3 min warmer Ischämie ausgesetzt waren. Hingegen wurden die Lebern der Gruppe 2 keiner warmen Ischämie ausgesetzt, da sie der 4°C kalten Konservierungslösung entnommen wurden. Der endotheliale Schaden ist gemessen am Hyaluronsäureabbau in Gruppe 3 und in Gruppe 1 niedriger ausgefallen als in Gruppe 2. Dies deckt sich mit neueren Zellkulturuntersuchungen, die belegen, daß die Kälte Schäden am Endothel verursacht und weniger die Hypoxie^{125,126}.

In Gruppe 4 überlebten mit einer mittleren warm ischämischen Phase von 10 min fünf von sechs transplantierten Schweinen ohne Leberversagen. Somit finden die Daten von Hickman Bestätigung, daß Schweinelebern eine warme Ischämie von über einer Stunde tolerieren können⁵⁵. Bei dem vorliegenden Protokoll handelte es sich um eine komplette warme Ischämie und nicht um eine eventuell nur partielle, wie sie durch ein Pringle Manöver induziert wird¹²⁷. Ein Leberausfall in Gruppe 4 zeigt aber auch, daß sich das warm ischämische Intervall von 103 Minuten nahe an der maximal tolerierten Grenze befindet. Alle hepatozellulären Meßgrößen fielen in Gruppe 4 ungünstiger aus als in den Gruppen 1,2,3, und 6. Auffallend war neben den sehr hohen Enzymaktivitäten, daß sich morphologisch in der LM und EM deutliche Zeichen einer hepatozellulären Schädigung fanden. Hierzu zählten eine teilweise Zerstörung der Leberzellbalken, Gruppenzellnekrosen sowie eine panlobuläre Vakuolisierung (Abbildung 53 und 54). Erstaunlich war, daß das Endothel in der Kapazität Hyaluronsäure zu metabolisieren nicht so sehr eingeschränkt wurde wie in Gruppe 2 (Abbildung 27), wenngleich die Unterschiede nicht signifikant waren. In der EM war das Endothel der Gruppe 4 stärker geschwollen als in Gruppe 1 oder 3. Warum der vergleichsweise unauffällige Aspekt des Endothels der Gruppe 2 nicht mit einem ungestörten Hyaluronsäureabbau einher geht, ist noch nicht geklärt. Nach Rücksprache mit Lemasters ist es eventuell darauf zurückzuführen, daß das elektronenmikroskopisch bewertete Anschwellen des Endothels auf seiner Fähigkeit beruht zu ballonieren. Unter Kälte verliert das Cytoskelett möglicherweise diese Eigenschaft, was ihm elektronenmikroskopisch ein normales Aussehen verleiht, aber als Schutzmechanismus nicht zur Verfügung steht. Dies deckt sich in einigen Aspekten mit den Zellkulturergebnissen von Rauen¹²⁵.

Alle Schweine in Gruppe 5 entwickelten nach Transplantation ein primäres Organversagen. Nach 6 min warmer Ischämie und 4h Kaltkonservierung in UW war die Reperfusionphase durch ein ungewöhnlich inhomogenes Erscheinungsbild der Leber gekennzeichnet. Rosafarbige gut perfundierte Bereiche waren umgeben von großen lividen und hypoperfundierte Arealen. Bereits die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigten eine weitgehende Destruktion der Leberzellbalken, Gruppenzellnekrosen und massive Einblutungen (Abbildung 55). Bemerkenswert ist ferner der Verlust der Sinusbegrenzung. Nur vereinzelt ließen sich Sinusendothelzellen darstellen (Abbildung 56). Das morphologische Erscheinungsbild spiegelt sich in den biochemischen Ergebnissen wieder. Die anfallende Hyaluronsäure wurde praktisch nicht abgebaut. Im Vergleich zu den anderen Gruppen erreichte die Hyaluronsäurekonzentration Höchstwerte. Besonders aufschlußreich ist der Verlauf der α -GST, weil sie eine besonders kurze Halbwertszeit hat. Es zeigt sich in Gruppe 4 bereits drei Stunden nach Transplantation

ein deutlicher Abfall, während die Konzentrationen in Gruppe 5 kontinuierlich steigen. Diese Korrelation findet auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie Bestätigung¹²⁸. Die anfänglich niedrigeren Aktivitäten der Transaminasen in Gruppe 5 erklären sich dadurch, daß – wie auch makroskopisch und mikroskopisch zu belegen – nicht alle Areale der Leber ausreichend reperfundiert waren. Somit konnte zunächst nur ein Teil der freigesetzten Enzyme die Zirkulation erreichen. Die anfänglich niedrigeren Transaminasenspiegel sind bei Lebern mit einer derart gestörten Mikrozirkulation eher trügerisch.

Alle transplantierten Schweine der Gruppe 5 verstarben innerhalb der ersten 24h nach Reperfusion. Der postoperative Verlauf war gekennzeichnet durch eine diffuse Blutungsneigung. Es war nicht möglich auf die mechanische Beatmung zu verzichten, da die Schweine keine ausreichende Spontanatmung entwickelten. Innerhalb der letzten Stunden traten hypotone Phasen auf, trotz Volumensubstitution und Gabe von Katecholaminen. Es mußte sukzessiv der FiO_2 bis auf 1,0 gesteigert werden.

Aus diesen Verläufen sowie den morphologischen und biochemischen Ergebnissen muß geschlossen werden, daß eine warm ischämische Phase von 6 min der eine kalt ischämische Phase von 4 Stunden folgt, zu einem primären Transplantatversagen führt. Des weiteren wird gefolgert, daß die Kaltkonservierung bei Lebern von NHBD mit den erwähnten Zeiträumen nicht das geeignete Konservierungsverfahren darstellt.

Bei keinem der transplantierten Tiere in Gruppe 6 kam es zu einem Leberausfall. Intraoperativ war die Reperfusion ähnlich homogen und ungestört wie auch in den anderen Gruppen 1,2,3 und 4. Morphologisch fand sich im Unterschied zu Gruppe 5 eine weitgehend intakte Leberläppchen Architektur (Abbildung 57- Abbildung 59). Die Sinusendothelzellen waren geschwollen, aber in ihrer Kontinuität erhalten (Abbildung 60).

Laborchemisch fiel auf, daß die Enzymaktivitäten deutlich unter den der Gruppe 4 lagen, der hepatozelluläre Schaden somit weniger stark ausgeprägt war. Dies läßt sich auf zwei Faktoren zurückführen. Zunächst betrug die Phase der kontinuierlichen warmen Ischämie in Gruppe 6 7 min und nicht wie in Gruppe 4 10 min. Es erfolgte dann mit der NELP die Reoxygenierung. Wenngleich die Phasen der warmen Ischämie in beiden Gruppen etwa gleich lang waren (10 min in Gr. 4 zu 6 min plus 1 min plus 3 min = 11 min in Gr. 6) ist zu vermuten, daß sich die Hepatozyten in Gruppe 6 über einen Zeitraum von 4 Stunden regenerieren konnten, bevor sie wieder einer operationstechnisch bedingten warmen Ischämie ausgesetzt waren. Wie die Galleproduktion während der NELP zeigt (Abbildung 38), waren die ATP Konzentrationen offensichtlich ausreichend¹²⁹. Des weiteren ist anzunehmen, daß während der NELP schon ein Anteil der Transaminasen, welche durch Membranschäden der Hepatozyten nach 7 min warmer Ischämie ausgetreten sind, durch das Perfusat (Abbildung 34 - Abbildung 37) ausgespült wurden.

Die hohe Metabolisierungsrate der Hyaluronsäure (Abbildung 27) weist in Gruppe 6 auf ein funktionell intaktes Endothel hin. Hierin besteht auch morphologisch ein wesentlicher Unterschied zu den Lebern in Gruppe 5.

Erstmals konnte somit der Nachweis geführt werden, daß es möglich ist, Lebern von NHBD nach 6 min warmer Ischämie und 4 Stunden NELP erfolgreich zu transplantieren, während die kalte statische Konservierung in UW versagte.

Eine weitere wesentliche Voraussetzung für die Nutzung von NHBD Lebern, besteht in der Notwendigkeit vor der Transplantation Aussagen über die Organqualität treffen zu können. Während dieser Punkt bei der Nierentransplantation durch die Verfügbarkeit der Hämodialyse im Falle eines primären Transplantatversagens nicht eine solch immense Bedeutung hat, hängt beim Organempfänger einer Leber das Leben von der primären Transplantatfunktion ab.

Wie wichtig das Monitoring der Organfunktion nach Explantation ist, wird deutlich, wenn man bedenkt, daß es in vielen Fällen nach Herzstillstand und Reanimationsversuchen nicht möglich ist, mit Bestimmtheit zu sagen, wie lange die Leber hypoperfundierte und ischämisch war oder welche Auswirkungen die unter Reanimationsbedingungen applizierten Katecholamine auf die Leberfunktion hatten. Wird danach eine Leber entnommen und statisch kalt konserviert ließe sich erst nach erfolgter Transplantation die Leberfunktion bestimmen. Die NELP hingegen bietet dadurch, daß die Leber physiologisch perfundiert wird, eine sehr gute Möglichkeit die Funktion einzuschätzen. Direkt an der perfundierten Leber kann die Galleproduktion⁴⁰ gemessen, der Sauerstoffverbrauch berechnet und der Perfusionswiderstand ermittelt werden. Des weiteren können auch die Transaminasen, während die Perfusion läuft, bestimmt werden. Es kann natürlich nicht an Hand der hier vorgelegten Studie gefolgert werden, ab welcher Galleproduktion, Sauerstoffverbrauch oder ab welchem Widerstand die Lebern viabel sind und wann nicht. Dies bedürfte eines komplett neuen Studienentwurfs. Trotzdem kann man auf Grund der zahlreichen Gemeinsamkeiten zwischen porcinen und humanen Lebern annehmen, wenn ähnliche Daten während einer humanen Leberperfusion wie im obigen Protokoll während der Schweineleberperfusion erzielt werden, eine primäre Leberfunktion nach Transplantation sehr wahrscheinlich ist.

Alle gewonnenen Ergebnisse insbesondere der Gruppen 5 und 6 lassen den Schluß zu, daß die NELP das geeignetere Verfahren zu Konservierung von Lebern nicht herzschlagender Spender ist.

4.5 Rückschlüsse für die Klinik

Die vorgelegte tierexperimentelle Studie unterscheidet sich in einigen Aspekten von einer klinischen Situation. Während in dem obigen Protokoll definierte Bedingungen vorlagen, z.B. exakt 6 min komplette Ischämie vor Hepatektomie, ist bei der klinischen Anwendung von einer unbestimmten Zeit warmer Ischämie auszugehen. Die möglichen Organspender lassen sich in vier Kategorien einteilen: 1. Unfallopfer, die bei Ankunft in der Klinik bereits verstorben sind, 2. nach frustraner Reanimation, 3. bei bevorstehendem Herzstillstand, - z.B. wenn die intensivmedizinische Behandlung abgebrochen wird -, und 4. nach Herzstillstand bei Hirntoten Patienten¹³⁰. Diese Heterogenität der Spender verdeutlicht, wie schon eingangs erwähnt, die Notwendigkeit eines Organmonitorings nach Explantation, aber auch die Notwendigkeit einer gut organisier-

ten Logistik vor Ort. Diesem Aspekt ist besonderes Augenmerk zu widmen. Denkbar ist die Schaffung eines Explantationsteams, das den Verstorbenen sofort nach der Diagnose des Herzstillstandes und Feststellung des Todes in den OP transportiert.

Parallel hierzu muß von einem zweiten Team die Perfusionsmaschine hergerichtet und mit Blutkonserven und Dialysat gefüllt werden, damit direkt nach Explantation die Leber an die NELP angeschlossen werden kann. Während die NELP mit der entnommenen Leber läuft, sollten Viabilitätsuntersuchungen durchgeführt werden. Wenn die Leberqualität als gut angesehen werden kann und nur dann, müßte der Empfänger narкотisiert und anschließend hepatektomiert werden. Nach Entnahme aus der NELP, mit der unweigerlich das zweite Intervall warmer Ischämie beginnt, sollte die Transplantation besonders zügig erfolgen können. Insbesondere scheint es sinnvoll, um Ischämiezeit zu sparen, die Reperfusion bereits nach Fertigstellung der suprahepatischen V. Cava Anastomose und Pfortaderanastomose durchzuführen.

Neben diesen logistischen und operativen Abläufen müssen vor einer klinischen Anwendung auch ethische und rechtliche Belange erörtert und geklärt werden. Es stellen sich folgende Fragen: Stimmen die Angehörigen der Organentnahme zu und wann? Könnte der Patient schon mit Unterzeichnung des Krankenhausbehandlungsvertrags einen Passus unterzeichnen, der die Organentnahme im Falle des Todes erlaubt? Zur Zeit schließt das deutsche Transplantationsgesetz im §5 Abs. 1 Nr. 2 die Nutzung von NHBD praktisch aus, da der „endgültige, nicht behebbare Stillstand von Herz und Kreislauf eingetreten und seitdem mehr als drei Stunden vergangen sein müssen“. Eine solche gesetzliche Einschränkung findet sich in keinem anderen Land und ist wohl auch nur unter dem Gesichtspunkt der öffentlichen Meinungsbildung zu verstehen. Die Klippe einer erneuten Diskussion darüber, wann ein Mensch tot ist und warum denn nicht nur Organe von NHBD genutzt werden, konnte hierdurch umschifft werden. Auf dem 5. Kongreß der „International Society of Organ Sharing“, in Maastricht, NL, im April 1999 berichtete Kootstra, daß 1998 in seiner Klinik mehr als 40% der Nierenspenden von NHBD stammten und diese Zahl in den USA bereits 6% aller Nierenspenden aus allen Zentren betrifft. Bedenkt man, daß nur eine geringe Anzahl der Kliniken tatsächlich über eine NHBD-Logistik verfügen, verdeutlicht sich das enorme, nicht genutzte Potential an transplantablen Nieren. Bei weiter ansteigenden Wartelisten dürfte es nur eine Frage der Zeit sein, wann eine Novellierung dieser Gesetzespassage folgt.

Die Vorgehensweise, die auf dem „Workshop on NHBD“ in Maastricht, 1994, vorgeschlagen wurde und auch seither in den Niederlanden, Großbritannien und anderen europäischen Ländern praktiziert wird, könnte Vorbildfunktion übernehmen: 10 Minuten nach Herzstillstand werden abgewartet, um in dieser Zeit den Hirntod sicher eintreten zu lassen, da 10 Minuten ohne Zirkulation bei Normothermie irreversibel die Hirnfunktion schädigen¹³¹. Denkbar wäre auch, daß der Verstorbene anschließend sofort zur Hepatektomie in den OP gebracht würde.

Die klinischen Ergebnisse für die Nierenspende sind unstrittig, in Bezug auf die Leberspende von NHBD liegen solche bisher nicht vor. Die vorgestellten experimentellen Resultate könnten einen ersten Schritt zur Umsetzung in eine klinische Studie rechtfertigen. Es erscheint notwendig, daß nachdem das Transplantationsgesetz in Deutschland nun verabschiedet ist, erneut der Meinungsaustausch mit Patientenorganisationen, christlichen Einrichtungen und Ethikkommissionen sowie der Legislative gesucht wird.

4.6 Einsatzmöglichkeiten der NELP als Konservierungsmethode

Hickman et al. zeigten, daß 120 Minuten warme Ischämie zu einer 100%igen PNF führen⁵⁵. Es kann als gesichert gelten, daß der Schaden, den eine Leber unter warm ischämischen Bedingungen über einen Zeitraum von vier Stunden erleidet, irreversibel ist. Wird die Leber in UW über 4 Stunden kalt konserviert, ohne vorherige warme Ischämie, resultiert postoperativ eine gute Organfunktion (Gruppe 2). Das gleiche trifft für die Organfunktion nach 4 Stunden NELP (Gruppe 3) zu. Die Kaltkonservierung in UW bietet gemessen am Überleben und der Leberfunktion der transplantierten Schweine gegenüber der NELP keine Vorteile. Erstmals kann somit für die NELP gezeigt werden, daß sie tatsächlich eine alternative Konservierungsmethode zur Kaltkonservierung darstellt.

Ein wie im obigen Protokoll verwendeter Perfusionszeitraum von 4 Stunden reicht für klinische Anwendungen nicht aus. Insbesondere wiegen die potentiellen Vorteile der NELP, wie zum Beispiel das Leberfunktionsmonitoring, nicht die unbestreitbaren Vorteile der Kaltkonservierung, wie die einfache Handhabung, niedrigen Kosten und längeren Konservierungszeiten auf.

Es muß die Frage gestellt werden, ob sich dieser Zeitraum von 4 Stunden verlängern läßt. Mit dem vorliegenden Studienprotokoll und den gewonnen Ergebnissen läßt sich diese Frage nicht sicher beantworten, da keine längeren Perfusionszeiträume als 4 Stunden mit anschließender Transplantation untersucht wurden. Aber die Annahme, daß 4 Stunden NELP nicht den maximal längsten Zeitraum darstellen, wird durch das Überleben der Schweine in Gruppe 6 gestützt. Es liegt nahe zu vermuten, daß eine ischämisch geschädigte Leber nach 4 Stunden NELP primär funktioniert, auch nach mehr als 4 Stunden NELP ohne vorherige warme Ischämie, ihre Funktion aufnehmen wird. Auf welche Zeiträume sich dieses Konservierungsintervall ausdehnen lassen wird, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten. Neuhaus konnte zeigen, daß auch nach 24 Stunden Perfusion die Lebern, als wichtiges Viabilitätskriterium, reichlich Galle produzierten und die Freisetzung von Transaminasen niedrig war⁴⁴.

Zusammengefaßt ist das Potential der NELP als experimentelle Konservierungsmethode bisher noch nicht ausgeschöpft. Während die Kaltkonservierung unter statischen Bedingungen bei 0°C einem sterbenden System gleichkommt, da auch bei dieser Temperatur eine Proteolyse in den Hepatozyten stattfindet¹³², trifft dies bei der NELP nicht zu. Wenn man die verbrauchten Substrate während der normothermen Perfusion

substituiert und die anfallenden Metabolite beseitigt (Galle, Dialyse), stößt das Konzept der NELP nicht mehr an theoretische Grenzen, wie sie dem Konzept der Metabolismusreduktion unter Kaltkonservierung inne wohnen.

Diese Überlegungen sollten Anlaß geben den Perfusionszeitraum der NELP in weiteren Studien systematisch auszudehnen.

4.7 Einsatzmöglichkeiten der NELP zur Einsparung von Tierversuchen

Dem Tierschutz wird in den letzten Jahren in unserer Gesellschaft eine zunehmende Bedeutung eingeräumt. Die Entnahme einer Leber bei einem narkotisierten Tier gilt als sogenannter Akutversuch und ist bei der Behörde nur anzeigepflichtig. In einem Versuch, bei dem Untersuchungen am nicht narkotisierten Tier durchgeführt werden, unterliegen die Tiere bedeutend größeren Belastungen. Deshalb ist auch ein unvergleichlich aufwendigeres Genehmigungsverfahren erforderlich.

In der Gruppe 3 konnte gezeigt werden, daß eine Leber nach 4 Stunden NELP in der von uns entwickelten Apparatur mit guter postoperativer Funktion transplantiert werden kann. Somit war die normotherme Perfusion besonders physiologisch. Dies legt die Verwendung der NELP für biochemische, pharmakologische und physiologische Untersuchungen nahe, welche bisher überwiegend nur im Tierversuch durchgeführt werden konnten.

Bereits in der Vergangenheit konnten wir zeigen, daß Schweinelebern aus Schlachthöfen für Konservierungsuntersuchungen und zur Isolation von Hepatozyten für Zellkulturuntersuchungen genutzt werden können^{56,133}. Durch die Aufnahme der Organfunktion in Gruppe 6 nach LTX, konnte gezeigt werden, daß auch unter diesen Bedingungen die NELP ein Funktionieren der Leber erlaubt. Wie die Produktion von Galle und Harnstoff und der Abbau der Hyaluronsäure verdeutlichen, gibt es Unterschiede zwischen den Lebern der Gruppe 3 und 6, aber das Überleben der Tiere belegt, daß es sich nur um eine transitorische gering gradige Funktionseinbuße der Lebern nach warmer Ischämie handelte. Somit lassen sich vermutlich mit Lebern die in Schlachthöfen unter warm ischämischen Bedingungen gewonnen wurden, relevante Untersuchungen durchführen. Dies kann zu einer weiteren Einsparung sowohl von Versuchstieren als auch Tierversuchen führen.

4.8 Transaminasenfreisetzung nach hepatozellulären Schäden bei Ischämie

Die Enzyme GOT, GPT und LDH haben sich in der Klinik als wesentliche Meßgrößen der Leberzellschädigung etabliert¹³⁴⁻¹³⁶. Sie werden zum Monitoring hepatozellulärer Schäden herangezogen, wenngleich die Enzyme es nicht erlauben zwischen Abstoßung, Infektion oder Ischämieschäden zu unterscheiden¹³⁷. In dieser Studie kam es in keinem Fall zu hyperakuten Abstoßungsreaktionen, was im Schweinelebertransplantationsmodell auch fast ausschließlich nur dann beobachtet wird, wenn zuvor gegen den Spender mit einem Hauttransplantat sensibilisiert wurde^{101,138}. Auch konnten Gefäß-

verschlüsse, die öfter bei der pädiatrischen Lebertransplantation auftreten, nach den erfolgten Obduktionen ausgeschlossen werden¹³⁹⁻¹⁴². Fulminante Hepatitiden, wie sie auch durch Reinfektion nach Lebertransplantation auf dem Boden einer Hepatitis B oder C auftreten können^{143,144}, sind ebenfalls in diesem Protokoll auszuschließen. Daraus kann gefolgert werden, daß die Freisetzung der Enzyme allein auf hepatozelluläre Schädigung durch warme und kalte Ischämie zurückzuführen ist.

Der nach Lebertransplantation im Serum meßbare Aktivitätsanstieg korreliert mit dem Ausmaß des ischämischen Schadens¹⁴⁵⁻¹⁴⁹. In Gruppe 4 mit langer (103 min) warmer Ischämie und damit größerer hepatozellulärer Schädigung sind die Enzymaktivitäten in stärkerem Ausmaß angestiegen als in Gruppe 1 mit kurzer (35 min) warmer Ischämie oder in der zweiten Gruppe nach kalter Ischämie (Abbildung 23: - Abbildung 26).

Die Enzyme reagieren unterschiedlich auf denselben hepatozellulären Schaden. Bei geringeren Schäden, wie in den Gruppen 1, 2 und 3, zeigt GPT im Gegensatz zu den anderen Enzymen keinen wesentlichen Aktivitätsanstieg. GPT stellt einen Indikator für deutlicher ausgeprägte hepatozelluläre Schäden dar, da sie nur in der vierten und fünften Gruppe, in der die größte hepatozelluläre Schädigung entstand, über längere Zeit signifikant angestiegen war (Abbildung 25)^{55,135,150-152}.

4.9 α -GST-Freisetzung infolge hepatozellulärer Schäden

Klinische Studien zeigten, daß die Konzentration der α -GST bei Störungen der hepatozellulären Integrität, hervorgerufen durch Hepatitis-C-Infektion^{153,154}, Paracetamol-Intoxikation¹⁵⁵, hepatozelluläres Karzinom und Alkoholintoxikation¹⁵⁶ sowie bei akuten Rejektionen^{157,158} ansteigt. Bisher gibt es keine Untersuchungen, in denen die Auswirkung von unterschiedlichen kalten und warm ischämischen Perioden auf die Freisetzung der α -GST bestimmt wurde. In den Gruppen 1-6 finden sich definierte Bedingungen, so daß die Freisetzung von α -GST auf die zuvor verursachte Ischämie zurückgeführt werden kann.

Während diese Studien mit dem für humane α -GST Bestimmungen hergestellten ELISA durchgeführt wurden, evaluierten wir erstmals den porcinen Test. Die Kreuzreaktivität zwischen dem humanen und porcinen Kit liegt unterhalb der Nachweisgrenze.

Die hier analysierten Enzyme α -GST, GOT, GPT und LDH reagieren unterschiedlich schnell mit einem signifikanten Aktivitäts- bzw. Konzentrationsanstieg auf die Zellschädigung. Sie erreichen zu verschiedenen Zeitpunkten den gemessenen Maximalwert.

Der zeitliche Verlauf der Enzymfreisetzung ist abhängig von der Enzymkonzentration in den Hepatozyten. Während α -GST in periportalen und zentrilobulären Zellen annähernd homogen verteilt ist, weisen die Transaminasen in den periportalen Hepatozyten die höchsten Aktivitäten auf¹⁵⁹. Die zentrilobulären Hepatozyten werden durch Ischämie stärker geschädigt als die periportalen¹⁶⁰. Wegen der niedrigeren Aktivitäten können daher kleinere Schäden an perizentralen Hepatozyten durch GOT, GPT und LDH weniger sensitiv erfaßt werden¹⁶¹.

α -GST ist ein relativ kleines Enzym mit einem MG von 50.000, wenn man es mit den Transaminasen vergleicht. Die GOT weist ein MG von 93.000 auf, die GPT von 110.000 und LDH von 134.000. Die Freisetzung könnte somit bei Zellmembranschäden früher erfolgen, was sich im Vergleich zur GOT am schnelleren Anstieg der Enzymkonzentration nach Reperfusion zeigt.

Die LDH-Aktivität zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die GOT-Aktivität in Gruppe 4 nach einstündiger warmer Ischämie. In den Gruppen 1-3 mit geringer hepatozellulärer Schädigung ist Anstieg und Abnahme der LDH-Aktivität im Vergleich zur GOT-Aktivität verzögert. Daher eignet sich die LDH-Aktivität ebenfalls nicht zur Kontrolle des aktuellen Zustandes der Leber und bewährt sich, wie die GOT-Aktivität, eher als Indikator bei retrospektiver Beurteilung der Leberschädigung.

Bereits am ersten Tag unterschieden sich die α -GST-Konzentrationen nicht mehr signifikant vom Referenzbereich (Abbildung 23:). Da als Ursache für die hepatozellulären Schäden im obigen Transplantationsmodell nur Ischämie in Frage kommt und diese nach Reperfusion zu keiner weiteren Schädigung führt, ist für die Konzentrationsabnahme der α -GST die kurze Halbwertszeit von 60-90 min verantwortlich. Die anderen Enzyme hingegen weisen längere Halbwertszeiten als α -GST (GOT 17 Stunden; GPT 47 Stunden; LDH 113 Stunden) auf¹⁶². Dadurch erreichten die Aktivitäten dieser Enzyme in allen Versuchsgruppen später als α -GST wieder den Referenzbereich. Zusammengefaßt korreliert der Verlauf der α -GST-Konzentration mit dem Schweregrad der ischämischen Schädigung, spricht aber schneller mit einem Konzentrationsanstieg und Abfall an, als die bisher verwendeten Enzyme.

4.10 Schlußfolgerung für die klinische Anwendung

Wenngleich die Untersuchungen sich auf Ischämieschäden beziehen belegen die klinischen Studien, daß die α -GST-Konzentration ein ubiquitärer Marker für hepatozelluläre Schäden ist, ähnlich den Transaminasen GOT, GPT und LDH. Für das intensivmedizinische Monitoring nach Lebertransplantation ist es vorteilhaft, wenn kurzfristig neue Schädigungen der Leber genau erfaßt werden können. Hierzu läßt der Aktivitätsverlauf von GOT, GPT und LDH nur eine zeitverzögerte Beurteilung des momentanen Zustandes der hepatozellulären Membranintegrität zu. α -GST scheint ferner besonders zur Erfassung frühzeitiger und geringgradiger Schädigungen geeignet zu sein. Für die Behandlung der Patienten ist ein frühzeitiges Erfassen zum Beispiel einer Leberarterienthrombose, eines primären Organversagens, einer Infektion oder Reinfektion der Leber mit Hepatitis B- oder C-Viren¹⁶³ oder einer CMV-Hepatitis vorteilhaft, um entsprechend therapeutisch intervenieren zu können. In wie weit diese Aufgabe auch durch ähnlich schnell reagierende lysosomale Enzyme erfüllt werden kann, bleibt zu untersuchen¹⁶⁴.

Aber auch der Therapieerfolg nach Prednisolonbolusgabe bei akuter Abstoßungsreaktion ließe sich frühzeitiger erfassen, wenn α -GST zum Monitoring eingesetzt wird. Das belegen auch neuere Studien¹⁵⁷. Sollte es zukünftig gelingen, für α -GST anstelle des

ELISA einen preiswerteren photometrischen Test zu entwickeln, wären alle Voraussetzungen für eine routinemäßige klinische Bestimmung der α -GST gegeben. Solange die α -GST nur als ELISA zur Verfügung steht, wird der klinische Einsatz nur bedingt erfolgen.

4.11 Beurteilung der Perfusionsergebnisse in den Gruppen 3 und 6

Durch die Integration des Dialysekreislaufs wurde die Kaliumkonzentration des Schweinevollbluts, das als Perfusat diente, von 6mmol/l auf 4,5mmol/l reduziert (Abbildung 33). Auch nach Reperfusion kam es zu keinem signifikanten Kaliumanstieg im Perfusat, weder in Gruppe 3 noch in Gruppe 6. Dies bestätigte die im Teil 1 dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse (Abbildung 13). Es zeigte sich, daß ein Dialysatvolumen von 10l mit einer Kaliumkonzentration von 2mmol/l ausreicht, um die Kaliumkonzentration während der Perfusion im physiologischen Konzentrationsbereich zu halten. Nach 1 min Perfusion hatten sich die Kaliumkonzentrationen im Perfusat und Dialysat ohne nennenswerte Unterschiede zwischen den Gruppen angeglichen.

Die Funktionsfähigkeit und der Schädigungsgrad einer extrakorporal perfundierten Leber läßt sich u.a. anhand der Galleproduktion, des Sauerstoffverbrauchs, der Freisetzung von Transaminasen sowie der morphologischen Veränderungen beurteilen^{60,116,152}. Wie die Abbildung 34 und Abbildung 35 zeigen, kommt es nach Reperfusion zu einem deutlichen Anstieg von α -GST und GOT. Die Maximalwerte waren nach 2 und 3 Stunden erreicht. Dies ist auf den initialen Ischämieschaden nach 6 min zurückzuführen, da sich in Gruppe 3 keine Zunahme der Transaminasenaktivität messen lies. Interessant ist, daß es nach 2 bzw. 3 Stunden zu keinem weiteren Anstieg kam. Hieraus läßt sich folgern, daß in Gruppe 6 die hepatozelluläre Membranintegrität zu diesem Zeitpunkt wiederhergestellt war. Es läßt sich ableiten, daß die NELP membranstabilisierend ist und somit potentiell Wiederbelebungsseffekte einleitet.

Die fehlende Aktivitätszunahme der Transaminasen in Gruppe 3 während der Perfusion - mit Ausnahme der LDH, welche auf Erythrozytenschädigungen durch die Rollerpumpen zurückgeführt wird - läßt den Schluß zu, daß die NELP in dem hier vorgestellten System zu keinen hepatozellulären Schäden führt⁶⁰. In der Literatur finden sich Hinweise, die zeigen, daß es bei der Verwendung einfacherer Perfusionssysteme zu einem kontinuierlichen Anstieg der GOT als Zeichen hepatozellulärer Schädigung während der Perfusion kommt^{165,166}.

Auch die morphologische Auswertung der Biopsien nach NELP zeigt eine gut erhaltene Leberarchitektur (Abbildung 49 und Abbildung 50, und Abbildung 57 und Abbildung 58). Dies kann als Ergebnis eines Perfusionskonzeptes gewertet werden, dessen Ziel es von vornherein war, möglichst physiologische Perfusionsbedingungen zu schaffen. Vergleicht man den Aktivitätsverlauf von GOT zwischen dem Versuchsaufbau des ersten mit dem des zweiten Protokolls (Abbildung 16 und Abbildung 35) zeigen sich Parallelen mit der Gruppe 6. Dies war zu erwarten, da in beiden Fällen die Leber einer warmen Ischämie von 90 bzw. 60 min ausgesetzt war. Die Dynamik unterscheidet sich

jedoch. Bereits nach zwei Stunden scheint die Freisetzung an GOT in Gruppe 6 zu stagnieren. Ob dies auf die längere warme Ischämie im Protokoll 1 oder auf die Verwendung der Perfusionskammer zurückzuführen ist⁴⁴, läßt sich nicht zweifelsfrei klären. Zur endgültigen Beurteilung hätte der Perfusionszeitraum in beiden Protokollen verlängert werden müssen.

Im Unterschied zur Leberperfusion in situ, bei der die Leber mit einem kontinuierlichen portalvenösen Fluß versorgt wird, wurde die Pfortader in unserer Apparatur über eine Rollerpumpe perfundiert. Da es hierbei unweigerlich zu Druckspitzen kommt, wäre eine Schädigung oder Funktionsbeeinträchtigung des Sinusendothels möglich gewesen. Wie die Abbildung 40 zeigt, findet sofort mit Reperfusion der Abbau der Hyaluronsäure statt, ohne signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Hieraus läßt sich ableiten, daß das Fehlen eines physiologischen Flußprofils in der Pfortader und Arterie auf die Funktionalität des Endothels unter den herrschenden Druck- und Flußbedingungen, wohl keinen nennenswerten Einfluß hat.

Das Endothel kann als Schutzschicht vor den Hepatozyten angesehen werden^{167,168,169}. 6 min warme Ischämie in Gruppe 6, scheinen die Funktionsfähigkeit des Endothels unter NELP Bedingungen nicht zu beeinflussen. Nach kurzer kalter Ischämie von 4h in den Gruppen 2 und 5 hingegen ist die Funktionalität gemessen am Hyaluronsäureabbau deutlich eingeschränkt. Als ein Zeichen des fehlenden Endothelschadens kann auch die weitgehend konstante Thrombozytenzahl gewertet werden (Abbildung 44). Die vermehrte Freisetzung der hepatozellulären Enzyme in Gruppe 6 während der Perfusion, weist darauf hin, daß der hepatozelluläre Schaden im gewissen Umfang unabhängig vom endothelialen Schaden ist. Erst die Kombination aus hepatozellulärem Schaden durch 6 min warme Ischämie und endothelialem Schaden durch 4 h kalte Ischämie, führte in Gruppe 5 zum unausweichlichen primären Organversagen.

Zusammengefaßt zeigten die Konstanz der Enzymaktivitäten in Gruppe 3, die gute morphologische Konservierung der Leberarchitektur und der Abbau der Hyaluronsäure in beiden Gruppen, daß die NELP auf hohem physiologischen Niveau durchgeführt werden kann. Somit war die wichtigste Voraussetzung zum Erreichen der Zielsetzung – der erfolgreichen Transplantation von Lebern aus NHBD - gegeben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Untersuchungen konnte am Modell der extracorporal perfundierten Schweineleber gezeigt werden, daß die simultane Dialyse des Perfusats zu einer Normalisierung des pH und einer physiologischen Kaliumkonzentration beiträgt. Lebern deren Perfusat dialysiert wurde, wiesen einen geringeren hepatozellulären Schaden und eine verbesserte Leberfunktion auf.

Eingangs wurde die Frage gestellt, ob sich die Methode der normothermen extracorporalen Leberperfusion (NELP) zur Organkonservierung eigne. Um für die Leberperfusion beste Voraussetzungen zu schaffen, wurde eine neue Leberperfusionsmaschine entwickelt. Auf der Überlegung basierend, daß eine normale Leberfunktion physiologische Perfusionsbedingungen benötigt, wurde neben dem integrierten Dialysekreislauf, als zweiter wesentlicher Bestandteil, die von Neuhaus beschriebene Organkammer genutzt. Im Schweinelebertransplantationsmodell konnte gezeigt werden, daß die transplantierten Lebern nach 4 Stunden NELP genauso zuverlässig funktionierten, wie in der Kontrollgruppe nach 4 Stunden Kaltkonservierung in University of Wisconsin Lösung (UW). Die hepatozelluläre Funktion, gemessen an biochemischen Parametern und morphologischer Auswertung, zeigte keine großen Unterschiede. Hingegen wies das Endothel nach NELP einen geringeren Funktionsverlust auf als nach Kaltkonservierung.

Klinisch hat sich die Lebertransplantation als therapeutisches Verfahren zur Behandlung terminaler Lebererkrankungen bewährt. Während die Anzahl der verfügbaren Organspender in den letzten 10 Jahren weitgehend konstant blieb, nahm die Zahl der Patienten auf den Wartelisten kontinuierlich zu. Eine Möglichkeit die Anzahl der Organspender zu steigern, stellt die Nutzung von nicht-herzschlagenden Spendern (NHBD) dar.

Es wurde im gleichen Projekt die Frage untersucht ob die Kaltkonservierung in UW oder die NELP geeignet sei, Lebern von NHBD zu konservieren. Vor Transplantation wurden die Lebern einer einstündigen warmen Ischämie im Spender ausgesetzt. Anschließend wurde -je nach Gruppenzuordnung- entweder sofort, nach vier Stunden UW-Kaltkonservierung oder vier Stunden NELP transplantiert.

Während alle Transplantatempfänger in der UW-Gruppe eine primär nicht funktionierende Leber erhielten und nicht länger als 24 Stunden überlebten, kam es in der NELP-Gruppe zu keinem Leberversagen. Die biochemische Funktionsanalyse und morphologische Auswertung bestätigte den deutlich besseren Zustand der transplantierten Lebern nach NELP. Die Kombination von warmer und kalter Ischämie in der UW-Gruppe führte zu einem histologisch nachweisbaren Verlust des Endothels und ausgeprägten Schäden der intralobulären Architektur.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben Anlaß, die NELP als Methode zur Organkonservierung zu berücksichtigen, insbesondere für Organe von nicht herzschlagenden Spendern.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ Starzl TE, Demetris AJ, van Thiel DH. Liver transplantation (1) N.Engl.J.Med. 1989; 321: 1014-1022.
- ² Starzl TE, Demetris AJ, van Thiel DH. Liver transplantation (2) N.Engl.J.Med. 1989; 321: 1092-1099.
- ³ Calne RY. Liver Transplantation - the Cambridge - King's College Hospital Experience. 1987; 2nd ed, London, Grune & Stratton, Inc. /Harcourt Brace Jovanovich.
- ⁴ Neuhaus P, Blumhardt G, Bechstein WO, Keck H. Fortschritte im Bereich der Lebertransplantation in den letzten 10 Jahren. Langenbecks.Arch.Chir.Suppl. 1992; Kongressbd.: 209-216.
- ⁵ Williams R, Wendon J. Indications for orthotopic liver transplantation in fulminant liver failure. Hepatology 1994; 20: 5-10.
- ⁶ Busuttil RW, Shaked A, Millis JM, Jurim O, Colquhoun SD, Shackleton CR, et al. One thousand liver transplants. The lessons learned. Ann.Surg. 1994; 219: 490-497.
- ⁷ Wood RP, Ozaki CF, Katz SM, Monsour HP, Jr., Dyer CH, Johnston TD. Liver transplantation. The last ten years. Surg.Clin.North Am. 1994; 74: 1133-1154.
- ⁸ Smit H, Sasse R, Zickgraf Th, Schoepe W, Molzahn M. Organspende und Transplantation in Deutschland 1997. 1997; Deutsche Stiftung Organtransplantation.
- ⁹ Jonas S, Bechstein WO, Keck H, Lemmens HP, Blumhardt G, Neuhaus P. Donor criteria in hepatic transplantation. Langenbecks.Arch.Chir. 1994; 379: 8-12.
- ¹⁰ Haller GW, Langrehr JM, Blumhardt G, Platz KP, Müller AR, Bechstein WO, et al. Factors relevant to the development of primary dysfunction in liver allografts. Transplant.Proc. 1995; 27: 1192-1192.
- ¹¹ Stratta RJ, Wood RP, Langnas AN, Duckworth RM, Markin RS, Marujo W, et al. The impact of extended preservation on clinical liver transplantation. Transplantation 1990; 50: 438-443.
- ¹² Alexander JW, Vaughn WK. The use of "marginal" donors for organ transplantation. The influence of donor age on outcome. Transplantation 1991; 51: 135-141.
- ¹³ Kootstra G, Kievit JK, Heineman E. The non-heart-beating donor. Br.Med.Bull. 1997; 53: 844-853.
- ¹⁴ Anaise D, Smith R, Ishimaru M, Waltzer WC, Shabtai M, Hurley S, et al. An approach to organ salvage from non-heartbeating cadaver donors under existing legal and ethical requirements for transplantation. Transplantation 1990; 49: 290-294.
- ¹⁵ Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Bronsther O, et al. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. Transplantation 1995; 59: 197-203.
- ¹⁶ White D. Alteration of complement activity: a strategy for xenotransplantation. Trends.Biotechnol. 1996; 14: 3-5.
- ¹⁷ Hammer C. Xenotransplantation: state of the art. Transplant.Proc. 1993; 25: 35-37.

- ¹⁸ Fung J, Rao A , Starzl TE. Clinical trials and projected future of liver xenotransplantation. *World J.Surg.* 1997; 21: 956-961.
- ¹⁹ First MR. Transplantation in the nineties. *Transplantation* 1992; 53: 1-11.
- ²⁰ Pegg DE, Jacobsen IA, Halasz NA. *Organ Preservation: basic and applied aspects.* 1982; Boston, Lancaster, the Hague, MTP Press Limited.
- ²¹ Hochachka PW. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 1986; 231: 234-241.
- ²² Belzer FO, Southard JH. Principles of solidorgan preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673-676.
- ²³ Singer D, Bretschneider HJ. Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological problems and natural examples - Part 1. *Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1990; 38: 205-211.
- ²⁴ Starzl TE, Marchioro TL, von Kaulla KN, Hermann G , Brittain RS, Waddel WR. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg.Gynecol.Obstet.* 1963; 117: 659-676.
- ²⁵ Pienaar BH, Stapleton GN, Bracher M, Lotz Z, Innes CR, Fourie J, et al. Six-hour porcine liver storage without flushing or perfusion. *Transplantation* 1991; 52: 38-43.
- ²⁶ Boudjema K, Lindell SL, Southard JH, Belzer FO. The effects of fasting on the quality of liver preservation by simple cold storage. *Transplantation* 1990; 50: 943-948.
- ²⁷ Jamieson NV. Improved organ preservation and its impact on the clinical programme. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 1989; 1: 83-86.
- ²⁸ Gubernatis G, Pichlmayr R, Lamesch P, Grosse H, Bornscheuer A, Meyer HJ, et al. HTK-solution (Bretschneider) for human liver transplantation. First clinical experiences. *Langenbecks.Arch.Chir.* 1990; 375: 66-70.
- ²⁹ Erhard J, Lange R, Scherer R, Kox WJ, Bretschneider HJ, Gebhard M, et al. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation. A prospective, randomized study. *Transplant.Int.* 1994; 7: 177-181.
- ³⁰ Kootstra G, Wijnen R, van Hooff JP, van der Linden CJ. Twenty percent more kidneys through a non-heart beating program. *Transplant.Proc.* 1991; 23: 910-911.
- ³¹ Daemen JW, Oomen AP, Janssen MA, van de Schoot L, van Kreel BK, Heineman E, et al. Glutathione S-transferase as predictor of functional outcome in transplantation of machine-preserved non-heart-beating donor kidneys . *Transplantation* 1997; 63: 89-93.
- ³² Rolles K, Foreman J, Pegg DE. A pilot clinical study of retrograde oxygen persufflation in renal preservation. *Transplantation* 1989; 48: 339-342.
- ³³ Hughes RD, Williams R. Use of bioartificial and artificial liver support devices. *Semin.Liver Dis.* 1996; 16: 435-444.

- ³⁴ Bernard MC. Lecons sur les propriétés physiologiques et les altérations pathologiques des liquides de l'organisme. In: Anonymous Cours de médecine. 1859; Paris, J.-B-. Baillière et fils. 92-137.
- ³⁵ Lie TS, Dengler HJ, Gutgemann A, Rommelsheim K, Leibach WK, Holst A, et al. Die extrakorporale Perfusion mit Pavianlebern zur Behandlung des Leberzerfalls-komas. Dtsch.Med.Wochenschr. 1977; 102: 1506-1511.
- ³⁶ Tung LC, Haring R, Waldschmidt J, Weber D. Erfahrungen mit der extrakorporalen Leberperfusion bei akutem Leberversagen. Zentralbl.Chir. 1980; 105: 1195-1205.
- ³⁷ Fischer M, Erhardt W, Krueger P, Maurer P, Stock M, Stotter L. Neue Behandlungsmöglichkeiten des terminalen Leberkomas. Med.Klin. 1974; 69: 975-978.
- ³⁸ Miller LL, Bly CG, Watson ML, Bale WF. Exptl.Med. 1951; 94: 431.
- ³⁹ Ryoo H, Tarver H. Studies on plasma protein synthesis with a new liver perfusion apparatus. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 1968; 128: 760-772.
- ⁴⁰ Eiseman B, Liem DS, Raffucci F. Heterologous liver perfusion in treatment of hepatic failure. Ann.Surg. 1965; 162: 329-345.
- ⁴¹ Abouna GM, Garry R, Kirkley J, Walder DN. Hepatic coma due to fulminating hepatitis treated with extracorporeal pig-liver perfusion. Br.J.Surg. 1969; 56: 223-225.
- ⁴² Chari RS, Collins BH, Magee JC, DiMaio JM, Kirk AD, Harland RC, et al. Treatment of hepatic failure with ex vivo pig liver perfusion followed by liver transplantation. N.Engl.J.Med. 1994; 331: 234-237.
- ⁴³ Neuhaus P. Extrakorporale Leberperfusion: Entwicklung und Erprobung eines neuen Modells - Habilitationsschrift. 1982; Medizinische Hochschule Hannover.
- ⁴⁴ Neuhaus P, Blumhardt G. Extracorporeal liver perfusion: applications of an improved model for experimental studies of the liver. Int.J.Artif.Organs 1993; 16: 729-739.
- ⁴⁵ Schön MR, Puhl G, Frank J, Neuhaus P. Hemodialysis improves results of pig liver perfusion after warm ischemic injury. Transplant.Proc. 1993; 25: 3239-3243.
- ⁴⁶ Sicular A, Moore FD. The postmortem survival of tissues: 2. The effect of time and temperature on the survival of liver as measured by glucose oxidation rate. JSR 1961; 1: 16-22.
- ⁴⁷ Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Herman B. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. Mol.Cell Biochem. 1997; 174: 159-165.
- ⁴⁸ Baumann M, Bender E, Stommer G, Gross G, Brand K. Effects of warm and cold ischemia on mitochondrial functions in brain, liver and kidney. Mol.Cell Biochem. 1989; 87: 137-145.
- ⁴⁹ Boudjema K, Lindell SL, Belzer FO, Southard JH. Effects of method of preservation on functions of livers from fed and fasted rabbits. Cryobiology 1991; 28: 227-236.
- ⁵⁰ Fujita S, Hamamoto I, Nakamura K, Tanaka K, Ozawa K. Effect of nutritional status on hypothermic liver perfusion. Nippon.Geka.Hokan. 1993; 62: 222-227.

- ⁵¹ Lemasters JJ, Thurman RG. Hypoxia and reperfusion injury to liver. *Prog.Liver Dis.* 1993; 11: 85-114.
- ⁵² Adkison D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM, Granger D. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol.Scand.Suppl.* 1986; 548: 101-107.
- ⁵³ Huguet C, Nordlinger B, Bloch P, Conard J. Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia. A biological study of 20 patients submitted to extensive hepatectomy. *Arch.Surg.* 1978; 113: 1448-1451.
- ⁵⁴ Nordlinger B, Douvin D, Javaudin L, Bloch P, Aranda A, Bosch M, et al. An experimental study of survival after two hours of normothermic hepatic ischemia. *Surg.Gynecol.Obstet.* 1980; 150: 859-864.
- ⁵⁵ Hickman R, Rose Innes C, Tyler M, Bracher M, Lotz Z, Fourie J. Energy charge as an indication of liver viability. A com-parison of changes in livers that remained intact with those subjected to autografting. *Transplantation* 1992; 53: 540-545.
- ⁵⁶ Schön MR, Hunt CJ, Pegg DE, Wight DG. The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993; 56: 24-31.
- ⁵⁷ Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow - an index of ischemic injury. *J.Surg.Res.* 1987; 42: 565-569.
- ⁵⁸ Kamiike W, Nakahara M, Nakao K, Koseki M, Nishida T, Kawashima Y, et al. Correlation between cellular ATP level and bile excretion in the rat liver. *Transplantation* 1985; 39: 50-55.
- ⁵⁹ Erlinger S. Bile FLOW. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, editors. *The Liver: Biology and Pathobiology.* 1988; 2nd ed., New York, Raven Press, Ltd.. 643-659.
- ⁶⁰ Adham M, Peyrol S, Chevallier M, Ducerf C, Vernet M, Barakat C, et al. The isolated perfused porcine liver: assessment of viability during and after six hours of perfusion. *Transplant.Int.* 1997; 10: 299-311.
- ⁶¹ Yanaga K, Makowka L, Lebeau G, Hwang RR, Shimada M, Kakizoe S, et al. A new liver perfusion and preservation system for transplantation research in large animals. *J.Invest.Surg.* 1990; 3: 65-75.
- ⁶² Wusteman MC. Comparison of colloids for use in isolated normothermic perfusion of rabbit kidneys. *J.Surg.Res.* 1978; 25: 54-60.
- ⁶³ Pegg DE, Wusteman MC, Foreman J. Metabolism of normal and ischemically injured rabbit kidneys during perfusion for 48 hours at 10°C. *Transplantation* 1981; 32: 437-443.
- ⁶⁴ Calne RY, Yoffa DE, White HJ, Maginn RR. A technique of orthotopic liver translatation in the pig. *Br.J.Surg.* 1968; 55: 203-206.
- ⁶⁵ Neuhaus P, Blumhardt G, Bechstein WO, Steffen R, Platz KP, Keck H. Technique and results of biliary reconstruction using side-to-side choledochocholedochostomy in 300 orthotopic liver transplants. *Ann.Surg.* 1994; 219: 426-434.
- ⁶⁶ Tumbleson ME. *Swine in biomedical research.* 1986; New York, Plenum Press.

- ⁶⁷ Altman PL. Blood and Other Body Fluids. 1961; Washington, DC., Federation of American Societies for Experimental Biology. .
- ⁶⁸ Hickman R, Saunders SJ, Terblanche J. Liver function in the pig. Total hepatic and portal flow values in vivo. S.Afr.Med.J. 1974; 48: 1197-1200.
- ⁶⁹ Weber M, Bircher J, Hacki W, Strebel H, Scholl E, Pedrinis E, et al. Substitution of the liver. III. Functional capacity of the homologously perfused pig livers. Biomedicine 1973; 18: 304-310.
- ⁷⁰ Nakajima Y, Kimura J, Isai H, Tamura M, Ito K, Kon H, et al. Study of the changes of serum hyaluronic acid during porcine liver transplantation: influence of warm ischemia. Artif.Organs 1996; 20: 1125-1129.
- ⁷¹ Tabet J, Garcíá-Valdecasas JC, Rull R, Valero R, Angás J, Gonzalez. Non-heart-beating donor pigs: the feasibility of liver donation. Transplant.Proc 1997; 29: 1374-1375.
- ⁷² Roussi J, Andre P, Samama M, Pignaud G, Bonneau M, Laporte A, et al. Platelet functions and haemostasis parameters in pigs: absence of side effects of a procedure of general anaesthesia. Thromb.Res. 1996; 81: 297-305.
- ⁷³ Kamachi H, Nakajima Y, Isai H, Kimura J, Tamura M, Ito K, et al. Study of liver function in a graft suffering from warm ischemia in porcine liver transplantation. Transplant.Proc. 1996; 28: 1789-1791.
- ⁷⁴ Fischer M, Jokiel HJ, von Sommoggy S, Wustrow T. The role of hemolysis during extracorporeal homologous liver perfusion. Int.J.Artif.Organs 1981; 4: 178-185.
- ⁷⁵ Sabatini D, Bensch K, Barnett R. New means of fixation for electron microscopy and histochemistry. Anat.Rec. 1962; 142: 274.
- ⁷⁶ Sabatini D, Bensch K, Barnett R. The preservation of changes in human Ito cells and their relation to postnecrotic liver fibrosis in massive and submassive hepatic necrosis. J.Cell Biol. 1963; 17: 19-58.
- ⁷⁷ Kiernan F. The anatomy and physiology of the liver. Philosoph.Transact.Roy.Soc.B. 1833; 123: 711-770.
- ⁷⁸ Rappaport AM. Betrachtungen zur Pathophysiologie der Leberstruktur. Klin.Wochenschr. 1960; 38: 561-577.
- ⁷⁹ Richards F, Knowles J. Glutaraldehyde as a protein crosslinking reagent. J.Mol.Biol. 1968; 37: 231-233.
- ⁸⁰ Hardy P, Nicholls A, Rydon H. The nature of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. Part I. Interaction of glutaraldehyde with the amino-groups of 6-aminohexanoic acid and of alpha-N-acetyllysine. J.Chem.Soc. 1976; Perkin Trans 1: 958-962.
- ⁸¹ Reynolds C. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J.Cell Biol. 1963; 208-212.
- ⁸² Kuo PC, Alfrey EJ, Garcia G, Haddow G, Dafoe DC. Orthotopic liver transplantation with selective use of venovenous bypass. Am.J.Surg. 1995; 170: 671-675.
- ⁸³ Schulze, W. Bickhardt K. Bollwahn W. Mickwitz G. v. Plonait H. Klinik der Schweinekrankheiten 1980; Hannover, Germany, Verlag M.&H. Schaper.

- ⁸⁴ Viebahn R, de Groot H, Lauchart W, Becker HD. Primäre Hepatozytenkulturen als Modell zur experimentellen Untersuchung der Leberkonservierung. *Langenbecks.Arch.Chir.* 1991; 376: 268-272.
- ⁸⁵ Rauen U, Noll T, Piper HM, Lauchart W, Becker HD, de Groot H. Endothelial cell toxicity of preservation solutions: comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state. *Cryobiology* 1994; 31: 144-153.
- ⁸⁶ Rauen U, Hintz K, Hanssen M, Lauchart W, Bekker HD, de Groot H. Injury to cultured liver endothelial cells during cold preservation: energy-dependent versus energy-deficiency injury. *Transplant.Int.* 1993; 6: 218-222.
- ⁸⁷ Mochida S, Arai M, Ohno A, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. *Liver* 1994; 14: 234-240.
- ⁸⁸ Alexander B, Aslam M, Benjamin IS. Hepatic function during prolonged isolated rat liver perfusion using a new miniaturized perfusion circuit. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* 1995; 34: 203-210.
- ⁸⁹ Zhong Z, Jones S, Thurman RG. Glycine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow liver perfusion model in the rat. *Am.J.Physiol.* 1996; 270: G332-G338.
- ⁹⁰ Kamada N, Calne RY, Wight DG, Lines JG. Orthotopic rat liver transplantation after long-term preservation by continuous perfusion with fluorocarbon emulsion. *Transplantation* 1980; 30: 43-48.
- ⁹¹ Adam R, Astarcioglu I, Gigou M, Isaac J, Bismuth H. The influence of the glycogen content of the donor liver on subsequent graft function and survival in rat liver transplantation. *Transplantation* 1992; 54: 753-756.
- ⁹² vom Dahl S, Häussinger D. Experimental methods in hepatology. Guidelines of the German Association for the Study of the Liver (GASL). Liver perfusion--technique and applications. *Z.Gastroenterol.* 1997; 35: 221-226.
- ⁹³ Gores GJ, Kost LJ, La-Russo NF. The isolated perfused rat liver: conceptual and practical considerations. *Hepatology* 1986; 6: 511-517.
- ⁹⁴ Svensson G, Aldenborg F, Karlberg I. Effect of rearterialization on short-term graft function in orthotopic rat liver transplantation. *Eur.Surg.Res.* 1991; 23: 269-277.
- ⁹⁵ Tamaki T, Kamada N, Wight DG, Pegg DE. Successful 48-hour preservation of the rat liver by continuous hypothermic perfusion with haemaccel-isotonic citrate solution. *Transplantation* 1987; 43: 468-471.
- ⁹⁶ Emre S, Sumrani N, Youngelman D, Ding Z, Davis R, Hong JH. Orthotopic hepatic transplantation in the dog. *J.Invest.Surg.* 1992; 5: 51-59.
- ⁹⁷ van Gulik TM, Reinders ME, Nio R, Frederiks WM, Bosma A, Klopper PJ. Preservation of canine liver grafts using HTK solution. *Transplantation* 1994; 57: 167-171.
- ⁹⁸ Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, Laravuso R, Kalayoglu M, Southard JH, et al. Successful 24- to 30-hour preservation of the canine liver: a preliminary report. *Transplant.Proc.* 1988; 20: 945-947.
- ⁹⁹ Swindle MM, Smith AC, Hepburn BJ. Swine as models in experimental surgery. *J.Invest.Surg.* 1988; 1: 65-79.

- ¹⁰⁰ Bockhorn H. Die allogene Lebertransplantation. I. Morphologische und funktionelle Veränderungen in experimentellen Untersuchungen beim Schwein. *Res.Exp.Med.Berl.* 1981; 178: 79-101.
- ¹⁰¹ Colletti LM, Johnson KJ, Kunkel RG, Merion RM. Mechanisms of hyperacute rejection in porcine liver transplantation. Antibody-mediated endothelial injury. *Transplantation* 1994; 57: 1357-1363.
- ¹⁰² Calne RY, White HJ, Yoffa DE, Binns RM, Maginn RR, Herbertson RM, et al. Prolonged survival of liver transplants in the pig. *Br.Med.J.* 1967; 4: 645-648.
- ¹⁰³ Swindle MM, Smith AC, Laber Laird K, Dungan L. Swine in biomedical research: management and models. *ILAR News* 1994; 36: 1-5.
- ¹⁰⁴ Wolff H, Otto G. Die Lebertransplantation im Tierexperiment. *Z.Exp.Chir.* 1978; 11: 157-176.
- ¹⁰⁵ Häussinger D, Stehle T, Lang F. Volume regulation in liver: further characterization by inhibitors and ionic substitutions. *Hepatology.* 1990; 11: 243-254.
- ¹⁰⁶ Stoll B, Gerok W, Lang F, Häussinger D. Liver cell volume and protein synthesis. *Biochem.J.* 1992; 287: 217-222.
- ¹⁰⁷ Krebs HA. Metabolic requirements of isolated organs. *Transplant.Proc.* 1974; 6: 237-239.
- ¹⁰⁸ Steffen R, Ballmer FT, Luder PJ, Mettler D, Barbier PA. Extracorporeal isolated pig liver perfusion: influence of various blood primes on liver function. *Res.Exp.Med.Berl.* 1987; 187: 265-274.
- ¹⁰⁹ Skibba JL, Stadnicka A, Kalbfleisch JH. Hyperthermic liver toxicity: a role for oxidative stress. *J.Surg.Oncol.* 1989; 42: 103-112.
- ¹¹⁰ Skibba JL, Stadnicka A, Kalbfleisch JH, Powers RH. Effects of hyperthermia on xanthine oxidase activity and glutathione levels in the perfused rat liver. *J.Biochem.Toxicol.* 1989; 4: 119-125.
- ¹¹¹ Häussinger D. Liver and systemic pH-regulation. *Z.Gastroenterol.* 1992; 30: 147-150.
- ¹¹² Bourke E, Häussinger D. pH homeostasis: the conceptual change. *Contrib.Nephrol.* 1992; 100: 58-88.
- ¹¹³ Häussinger D, Gerok W, Sies H. The effect of urea synthesis on extracellular pH in isolated perfused rat liver. *Biochem.J.* 1986; 236: 261-265.
- ¹¹⁴ Cheung K, Hickman PE, Potter JM, Walker NI, Jericho M, Haslam R, et al. An optimized model for rat liver perfusion studies. *J.Surg.Res.* 1996; 66: 81-89.
- ¹¹⁵ Valero R, García-Valdecasas JC, Tabet J, Taura P, Rull R, Beltran J, et al. Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pigs. *Transplantation.* 1998; 66: 170-176.
- ¹¹⁶ Abouna GM, Ashcroft T, Hull C, Hodson A, Kirkley J, Walder DN. The assessment of function of the isolated perfused porcine liver. *Br.J.Surg.* 1969; 56: 289-295.
- ¹¹⁷ Dietschy JM. The biology of bile acids. *Arch.Intern.Med.* 1972; 130: 473-474.

- ¹¹⁸ Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, Ringe B, Lauchart W, Pichlmayr R. Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation* 1988; 45: 138-143.
- ¹¹⁹ Wolf CF, Gans H, Subramanian VA, McCoy CH. A rat model for study of bilirubin conjugation by a cultured cell artificial capillary liver assist device. *Int.J.Artif.Organs* 1979; 2: 97-103.
- ¹²⁰ Brunner G, Holloway CJ, Losgen H. The application of immobilized enzymes in an artificial liver support system. *Artif.Organs* 1979; 3: 27-30.
- ¹²¹ Lee D, Clark DG. Effect of fasting on the biochemical properties of perfused rat liver. *J.Surg.Res.* 1977; 23: 43-49.
- ¹²² Schön MR, Lemmens HP, Neuhaus P, Baehr P, Heil W, Pöhlein C, et al. Improved xenogeneic extra-corporeal liver perfusion. *Transplant.Proc.* 1994; 26: 1293-1297.
- ¹²³ Filipponi F, Bacci S, Romagnoli P. Normothermic liver perfusion ex situ: a resuscitation tool for hepatic grafts damaged by warm ischemia. *G.Chir.* 1993; 14: 254-258.
- ¹²⁴ Kahn D, Hickman R, Dent DM, Terblanche J. For how long can the liver tolerate ischaemia? *Eur.Surg.Res.* 1986; 18: 277-282.
- ¹²⁵ Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de-Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 1999; 13: 155-168.
- ¹²⁶ Rauen U, de-Groot H. Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. *Free Radic.Biol.Med.* 1998; 24: 1316-1323.
- ¹²⁷ Kim YI, Ishii T, Aramaki M, Nakashima K, Yoshida T, Kobayashi M. The Pringle maneuver induces only partial ischemia of the liver. *Hepatogastroenterology* 1995; 42: 169-171.
- ¹²⁸ Itasaka H, Kishikawa K, Suehiro T, Yanaga K, Shimada M, Higashi H, et al. Serum hyaluronic acid for the assessment of graft viability in porcine liver transplantation. *Surg.Today* 1994; 24: 719-724.
- ¹²⁹ Sumimoto K, Inagaki K, Yamada K, Kawasaki T, Dohi K. Reliable indices for the determination of viability of grafted liver immediately after orthotopic transplantation. Bile flow rate and cellular adenosine triphosphate level. *Transplantation* 1988; 46: 506-509.
- ¹³⁰ Candinas D, Schlumpf R, Rothlin MA, Binswanger U, Largiader F. Thirty-two years of renal transplantation in Zürich. *Clin.Transpl.* 1996; 241-247.
- ¹³¹ Kootstra G. Expanding the donor pool: the challenge of non-heart-beating donor kidneys. *Transplant.Proc* 1997; 29: 3620.
- ¹³² Calmus Y, Cynober L, Dousset B, Lim SK, Soubrane O, Conti F, et al. Evidence for the detrimental role of proteolysis during liver preservation in humans. *Gastroenterology* 1995; 108: 1510-1516.
- ¹³³ Schön MR, Puhl G, Gerlach J, Frank J, Neuhaus P. Hepatocyte isolation from pig livers after warm ischaemic injury. *Transplant.Int.* 1994; 7: 159-162.

- ¹³⁴ Farkouh EF, Daniel AM, Beaudoin JG, MacLean LD. Predictive value of liver biochemistry in acute hepatic ischemia. *Surg.Gynecol.Obstet.* 1971; 132: 832-838.
- ¹³⁵ Devlin J, Dunne JB, Sherwood RA, Chambers SM, Tan KC, Peters TJ, et al. Relationship between early liver graft viability and enzyme activities in effluent preservation solution. *Transplantation* 1995; 60: 627-631.
- ¹³⁶ Carles J, Fawaz R, Neaud V, Hamoudi NE, Bernard PH, Balabaud C, et al. Ultrastructure of human liver grafts preserved with UW solution. Comparison between patients with low and high postoperative transaminases levels. *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.* 1994; 26: 67-73.
- ¹³⁷ Calne RY. Transplantation of the liver. *Ann.Surg.* 1978; 188: 129-138.
- ¹³⁸ Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts . *Nature* 1969; 223: 472-476.
- ¹³⁹ Lemmens HP, Neumann U, Bechstein WO, Gukkelberger O, Lüsebrink R, Jonas S, et al. Incidence and outcome of arterial complications after orthotopic liver transplantation. *Transpl.Int.* 1996; 9 Suppl 1: S178-S181.
- ¹⁴⁰ Devlin J, Page AC, O'Grady J, Portmann B, Karani J, Williams R. Angiographically determined arteriopathy in liver graft dysfunction and survival. *J.Hepatol.* 1993; 18: 68-73.
- ¹⁴¹ Langnas AN, Marujo W, Stratta RJ, Wood RP, Shaw BW, Jr. Vascular complications after orthotopic liver transplantation. *Am.J.Surg.* 1991; 161: 76-82.
- ¹⁴² Rela M, Muiesan P, Bhatnagar V, Baker A, Mowat AP, Mieli Vergani G, et al. Hepatic artery thrombosis after liver transplantation in children under 5 years of age. *Transplantation* 1996; 61: 1355-1357.
- ¹⁴³ Hoofnagle JH, Carithers RL, Jr., Shapiro C, Ascher N. Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology* 1995; 21: 240-252.
- ¹⁴⁴ Johnson MW, Washburn WK, Freeman RB, Fitz-Maurice SE, Dienstag J, Basgoz N, et al. Hepatitis C viral infection in liver transplantation. *Arch.Surg.* 1996; 131: 284-291.
- ¹⁴⁵ Furukawa H, Todo S, Inventarza O, Wu YM, Scotti C, Day R, et al. Cold ischemia time vs outcome of human liver transplantation using UW solution. *Transplant.Proc.* 1991; 23: 1550-1551.
- ¹⁴⁶ Morimoto T, Kusumoto K, Isselhard W. Impairment of grafts by short-term warm ischemia in rat liver transplantation. *Transplantation* 1991; 52: 424-431.
- ¹⁴⁷ Battersby C, Hickman R, Saunders SJ, Terblanche J. Liver function in the pig. 1. The effects of 30 minutes' normothermic ischaemia. *Br.J.Surg.* 1974; 61: 27-32.
- ¹⁴⁸ Barbier PA, Luder PJ, Wagner HE, Barbier A, Mettler D. Orthotopic liver transplantation in pigs without cold perfusion of the donor liver. Evaluation by quantitative liver function tests. *Eur.Surg.Res.* 1986; 18: 293-301.
- ¹⁴⁹ Hellinger A, Fiegen R, Lange R, Rauen U, Schmidt U, Hirche H, et al. Preservation of pig liver allografts after warm ischemia: normothermic perfusion versus cold storage. *Langenbecks.Arch.Chir.* 1997; 382: 175-184.

- ¹⁵⁰ Hell E. Untersuchungen zur Pathophysiologie der orthotopen allogenen Lebertransplantation am Modell des Hausschweins. *Wien.Klin.Wochenschr.* 1973; 85: Suppl-18.
- ¹⁵¹ Gozzo ML, Avolio A, Forni F, Agnes S, Colacicco L, Barbaresi G, et al. Enzymatic determinations in acute rejection after liver transplantation: preliminary report on necrosis index. *Clin.Chim.Acta* 1993; 214: 175-184.
- ¹⁵² Mets B, Rose Innes C, Lotz Z, Hickman R, Chalton D. Comparison of in vivo and ex vivo porcine liver function using the same liver. *J.Hepatol.* 1993; 17: 3-9.
- ¹⁵³ Vaubourdolle M, Chazouilleres O, Briaud I, Legendre C, Serfaty L, Poupon R, et al. Plasma alpha-glutathione S-transferase assessed as a marker of liver damage in patients with chronic hepatitis C. *Clin.Chem.* 1995; 41: 1716-1719.
- ¹⁵⁴ Nelson DR, Lim HL, Oliver D, Qian KP, Davis GL, Lau JY. alpha-Glutathione S-transferase as a marker of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. *Am.J.Clin.Pathol.* 1995; 104: 193-198.
- ¹⁵⁵ Beckett GJ, Hayes JD. Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Adv.Clin.Chem.* 1993; 30: 281-380.
- ¹⁵⁶ Hayes PC, Bouchier IA, Beckett GJ. Glutathione S-transferase in humans in health and disease. *Gut* 1991; 32: 813-818.
- ¹⁵⁷ Hughes VF, Trull AK, Gimson A, Friend PJ, Jamieson N, Duncan A, et al. Randomized trial to evaluate the clinical benefits of serum alpha-glutathione-S-transferase concentration monitoring after liver transplantation. *Transplantation* 1997; 64: 1446-1452.
- ¹⁵⁸ Trull AK, Facey SP, Rees GW, Wight DG, Noble Jamieson G, Joughin C, et al. Serum alpha-glutathione S-transferase--a sensitive marker of hepatocellular damage associated with acute liver allograft rejection. *Transplantation* 1994; 58: 1345-1351.
- ¹⁵⁹ Rappaport AM. Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation. *Int.Rev.Physiol.* 1980; 21: 1-63.
- ¹⁶⁰ Lemasters JJ, Ji S, Thurman RG. Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver. *Science* 1981; 213: 661-663.
- ¹⁶¹ Bass NM, Kirsch RE, Tuff SA, Saunders SJ. Radioimmunoassay of plasma ligandin: a sensitive index of experimental hepatocellular necrosis. *Gastroenterology* 1978; 75: 589-594.
- ¹⁶² Keller H. *Klinische chemische Labordiagnostik für die Praxis.* 1986; Stuttgart, New York, Thieme Verlag.
- ¹⁶³ Cavallari A, De-Raffele E, Bellusci R, Miniero R, Vivarelli M, Galli S, et al. De novo hepatitis B and C viral infection after liver transplantation. *World J.Surg.* 1997; 21: 78-84.
- ¹⁶⁴ Chang CW, Imai K, Chang YC, Hayashi T, Kohno H, Nagasue N, et al. Plasma lysosomal enzymes after liver transplantation in the pig. *Enzyme* 1991; 45: 145-154.

- ¹⁶⁵ Ikeda T, Yanaga K, Lebeau G, Higashi H, Kakizoe S, Starzl TE. Hemodynamic and biochemical changes during normothermic and hypothermic sanguinous perfusion of the porcine hepatic graft. *Transplantation* 1990; 50: 564-567.
- ¹⁶⁶ Hickman R, Saunders SJ, Simson E, Terblanche J. Perfusion of the isolated pig liver. Functional assessment under control normothermic conditions. *Br.J.Surg.* 1971; 58: 33-38.
- ¹⁶⁷ Marzi I, Zhong Z, Lemasters JJ, Thurman RG. Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation. The importance of nonparenchymal cells. *Transplantation* 1989; 48: 463-468.
- ¹⁶⁸ Caldwell Kenkel JC, Thurman RG, Lemasters JJ. Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. *Transplantation* 1988; 45: 834-837.
- ¹⁶⁹ Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 1652-1660.

7. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. P. Neuhaus möchte ich für die Ausbildung in Klinik und Wissenschaft und seine Unterstützung bei der Neuentwicklung der Leberperfusionsapparatur danken.

Herrn Prof. Sir Roy Y. Calne, FRS, University of Cambridge, UK, möchte ich dafür danken, daß ich durch ihn die Lebertransplantation am Schweinmodell erlernen durfte und erfahren konnte, daß sich experimentelle Forschung und klinische Praxis wechselseitig positiv zu beeinflussen vermögen.

Herrn Prof. Dr. Ronald G. Thurman, Department of Pharmacology, University of North Carolina, Chapel Hill, USA, möchte ich für die Vermittlung einer wissenschaftlichen Arbeitsweise danken.

Herrn Dr. Harald Schrem, Herrn Gero Puhl, Frau Nermin Akkoc und Frau Katharina Kräutlein möchte ich für die wertvolle und unermüdliche Mitarbeit an der Durchführung der Transplantationen und Leberperfusionen danken und Herrn Ing. Peter Baer für den Aufbau der Perfusionsmaschine, deren Bedienung und Wartung. Herrn Dr. Steffen Wolf gebührt mein Dank für die ausgezeichnete Narkoseführung in einem schwierigen Modell.

Herrn Prof. Dr. N. C. Schnoy und Herrn Otto Kollmar möchte ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die wissenschaftliche Zusammenarbeit danken.

Frau Dr. Monika Matthes danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Habilitationsschrift.

Herrn PD Dr. W. Heil, Leiter der Klinischen Chemie, Klinikum Wuppertal und Herrn PD Dr. Settmacher, danke ich für die kritische Durchsicht der Habilitationsschrift.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für mein Ausbildungsstipendium an der Abteilung für Chirurgie, University of Cambridge, UK, sowie für die großzügige personelle und finanzielle Unterstützung der in Berlin durchgeführten Arbeiten gedankt (DFG Scho 408/1-1 bis 408/4-1). Für die Finanzierung der Leberperfusionsapparatur danke ich der Sonnenfeld Stiftung Berlin, ganz besonders dem Vorsitzenden Herrn Prof. Dr. H.J. Freiherr von Villiez.